

Università di Pisa



**Corso di Dottorato in “Morfologia e Funzione  
Normale e Patologica di Cellule e Tessuti”**

Titolo della tesi:

**Genotossicità ed alterazioni cellulari in risposta  
alla contaminazione ambientale.**

**Relatore:**

**Prof. Marco Nigro**

**Dottorando:**

**Ilaria Del Barga**

**Dott. Giada Frenzilli**

# Indice generale

<b>RIASSUNTO</b>	3
<b>ABSTRACT</b>	4
<b>INTRODUZIONE</b>	5
Accumulo e Biotrasformazione	7
Stress ossidativo	9
Lisosomi	12
Genotossicità	17
Apoptosi	22
Distruttori Endocrini	27
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	30
<b>MATERIALI E METODI</b>	31
Campionamenti	31
1. Esposizione acuta	31
<i>a. Esposizione ad idrocarburi a seguito di una perdita di petrolio nel porto di Göteborg</i>	31
<i>b. Effetti dell'esposizione a tossine algali</i>	32
2. Esposizione cronica	33
<i>a. Biomonitoraggio delle coste della Toscana</i>	33
<i>b. Utilizzo di animali trapiantati nel monitoraggio dell'ambiente marino costiero: foce del fiume Cecina</i>	34
<i>c. Valutazione ecotossicologica di un ambiente fluviale: fiume Cecina</i>	35
Analisi effettuate	36
Pesci	36
<i>Single Cell Gel electrophoresis</i>	36
<i>Test del micronucleo</i>	39
<i>Determinazione del sesso</i>	40
<i>Vitellogenina</i>	40
Mitili	41

<i>Single Cell Gel electrophoresis</i> .....	41
<i>Test del micronucleo</i> .....	42
<i>Rosso neutro</i> .....	43
<i>Lipofusina</i> .....	44
<i>Analisi morfometrica dei lisosomi</i> .....	45
 <b>RISULTATI E DISCUSSIONE</b> -----	46
1. Esposizione acuta.....	46
<i>a. Esposizione ad idrocarburi a seguito di una perdita di petrolio nel porto di Göteborg</i> .....	46
<i>b. Effetti dell'esposizione a tossine algali</i> .....	49
2. Esposizione cronica.....	51
<i>a. Biomonitoraggio delle coste della Toscana</i> .....	51
<i>b. Utilizzo di animali trapiantati nel monitoraggio dell'ambiente marino costiero: foce del fiume Cecina</i> .....	56
<i>c. Valutazione ecotossicologica di un ambiente fluviale: fiume Cecina</i> .....	61
 <b>CONCLUSIONI</b> -----	66
 <b>RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI</b> -----	67

# Riassunto

Le risposte cellulari alla contaminazione ambientale sono una tematica di attualità, in quanto il loro studio consente di comprendere i meccanismi che mediano il danno biologico associato all'inquinamento e forniscono strumenti per valutare la qualità ambientale. Per quanto riguarda gli ambienti acquatici, specie ittiche e molluschi bivalvi sono gli organismi più frequentemente utilizzati, sia come modelli animali per indagini di laboratorio, sia come specie sentinella per il biomonitoraggio ambientale. In questo lavoro sono state prese in esame le alterazioni genotossiche (sia in termini di *strand breaks* che di danno cromosomico), le modificazioni morfo-funzionali a carico del comparto lisosomale e l'induzione di fenomeni apoptotici in organismi acquatici esposti a contaminanti chimici e a tossine di origine algale. Il primo caso di studio ha riguardato una perdita consistente di petrolio durante le operazioni di pulizia di una cisterna nell'area portuale di Göteborg (Svezia), e quindi l'esposizione a idrocarburi policiclici aromatici a carico di una specie ittica. L'indagine, svolta in collaborazione con i ricercatori del Dipartimento di Zoologia/Zoofisiologia dell'Università di Göteborg, ha consentito di seguire l'andamento delle alterazioni biologiche nel tempo, in relazione alle operazioni di ripristino ambientale. Una seconda indagine ha riguardato l'esposizione a tossine prodotte da alghe marine. Infatti, queste costituiscono un potenziale rischio per la salute degli animali e dell'uomo, che può risulterne esposto attraverso la catena alimentare. Pertanto, è stato effettuato un esperimento finalizzato a valutare il potenziale danno genotossico e cellulare associato all'esposizione ad essudati dell'alga *Polysiphonia fucoides* la cui proliferazione massiccia ha destato preoccupazione lungo le coste del Mare del Nord. Il modello animale utilizzato è stata la trota arcobaleno (*Oncorhynchus mykiss*). I risultati hanno evidenziato che l'essudato di *P. fucoides* è responsabile di un aumento significativo di DNA *strand breaks* negli animali esposti. In un'ultima serie di indagini sono stati presi in esame alcuni siti prospicienti aree industriali lungo le coste della Toscana e lungo il corso del fiume Cecina, caratterizzati da una storia pregressa di contaminazione prevalentemente da metalli pesanti. In questo caso, le risposte genotossiche e lisosomali sono state integrate con lo studio del sistema antiossidante per approfondire i meccanismi alla base del danno cellulare. I bioindicatori scelti sono stati il mitili (*Mytilus galloprovincialis*) ed il cavedano (*Leuciscus cephalus*).

# Abstract

Biomarkers include a variety of measures of specific molecular, cellular and physiological responses of key species to contaminant exposure.

A response is generally indicative of either contaminant exposure or compromised physiological fitness. The challenge is to integrate individual biomarker responses into a set of tools and indices capable of detecting and monitoring the degradation in health of a particular type of sentinel organism.

In developed countries, aquatic environments are often subjected to several forms of disturbance, among which chemical pollution associated with industrial productions and high urbanization are of major concern. In this context, the use of fish and mussel biomarkers as indices of pollution effects are of increasing importance and can permit early detection of environmental problems.

This research has been focused on genotoxic alterations (strand breaks and chromosomic damage), morphological and functional modifications of lysosomes and induction of apoptotic phenomena in aquatic organisms exposed to chemical pollutants and to algal toxins.

The first case of study has regarded the evaluation of the biological impact of chemical contamination in the River Göta estuary, following a bunker oil spill (10–100 tonnes) occurred in June 2003. DNA strand breaks and the frequency of apoptotic cells were investigated in nucleated erythrocytes of the eelpout (*Zoarces viviparus*) by the Comet and Diffusion assay respectively. Moreover, the genotoxicity of algal extracts (*Polysiphonia fucoides*) was investigated in erythrocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under experimental conditions. A significant induction of DNA single strand breaks comparable to the ones induced by the in vivo exposure to 20 mg/kg B[a]P was observed at the end of the treatment, while increases of double strand breaks and apoptotic cells were not observed. Finally, a set of biomarkers based on DNA and lysosomal alterations was investigated in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) along the coast of Tuscany (in two industrial sites, Rosignano Solvay and Puntone Scarlino and at the estuary of river Cecina, characterized from a heavy metals contamination) and in the chub (*Leuciscus cephalus*) along the course of the river Cecina, that was selected as a “pilot basin” within the *Water Frame Directive* (2000/60 European Community), in order to improve strategies for management, environmental recovery and conservation.

# Introduzione

Con l'aumentata industrializzazione mondiale e con la concomitante richiesta di composti di sintesi, l'uomo si è trovato a fare i conti con problemi dovuti al rilascio di contaminanti tossici nell'ambiente.

La tossicità di una sostanza è una caratteristica sia qualitativa, poiché l'azione tossica dipende dall'interazione con le molecole biologiche, che quantitativa, dato che i suoi effetti si manifestano solo quando vengono superati determinati livelli di concentrazione nell'ambiente o nei tessuti dell'organismo.

L'obiettivo cui classicamente si tende nel misurare la tossicità di una sostanza è l'individuazione di una dose alla quale essa è capace di produrre uno o più effetti negli organismi tenuti in condizioni controllate, nelle quali siano note la concentrazione del composto tossico e la durata dell'esposizione. Tuttavia l'ambiente naturale pone severe limitazioni all'applicabilità di test tradizionali ed alle deduzioni riguardanti la valutazione del rischio ambientale poiché gli organismi, in un ambiente inquinato, sono di solito esposti a miscele complesse di sostanze chimiche potenzialmente tossiche, i cui effetti additivi, antagonisti e sinergici, possono difficilmente essere quantificati.

La comprensione degli eventi molecolari e cellulari, che si verificano tra l'esposizione e la comparsa di effetti biologici osservabili è fondamentale se si vuol ottenere una buona interpretazione del rischio ambientale e sanitario associato alla presenza di xenobiotici. In questo contesto, l'utilizzo dei biomarcatori (*biomarker*) è un utile strumento per la sorveglianza ambientale, che può fornire indicazioni predittive circa lo sviluppo di una situazione a rischio.

Un *biomarker* è definibile come una "variazione, indotta da un contaminante, a livello delle componenti biochimiche o cellulari di un processo, di una struttura o di una funzione, che può essere misurata in un sistema biologico". (Depledge, 1994). Poiché strutture cellulari, reazioni biochimiche e funzioni fisiologiche sono spesso comuni negli organismi viventi, l'utilizzo dei *biomarker* è potenzialmente applicabile ad un gran numero di specie ed in molti tipi di ecosistemi (Shugart, 1995). Alla base dell'utilizzo di biomarcatori per lo studio degli effetti della contaminazione chimica e la valutazione della qualità dell'ambiente, è fondamentale la comprensione della relazione dose/effetto (Depledge, 1994). La costruzione di curve dose/effetto è basata su studi condotti in laboratorio, nei quali l'organismo è esposto ad una singola sostanza e viene misurata una sola risposta (*biomarker*) ad una serie di dosi. Le informazioni ottenute sono, quindi, estrapolate per gli organismi che vivono in condizioni naturali. Tuttavia, come precedentemente illustrato, non è sempre semplice trasferire i risultati ottenuti in laboratorio all'ambiente naturale, spesso caratterizzato dalla presenza di miscele complesse di sostanze chimiche e dalla variabilità di parametri ambientali quali temperatura,

salinità, deficienze nutrizionali ed energetiche, stress da predazione, stato riproduttivo, ecc. (Shugart, 1995). Anche all'interno di una stessa popolazione gli individui possono rispondere in modo diverso ad un identico scenario d'esposizione, a causa, per esempio, della variabilità genetica, del diverso stato fisiologico o di variazioni nel microambiente. È, quindi, chiaro che i diversi stress interagenti, l'esposizione multipla e i processi fisiologici naturali potranno influenzare la relazione dose/effetto della risposta osservata.

Conseguentemente, nell'ambiente naturale, non è verosimile che si abbia un'unica relazione dose/effetto, che possa permettere la previsione dell'entità della risposta sulla base della dose del composto chimico preso in esame. È più ragionevole pensare ad una "famiglia" di relazioni dose/effetto, ognuna corrispondente a diverse combinazioni e permutazioni di sostanze chimiche interagenti e stress ambientali (Peakall e Shugart, 1993). La premessa di questo concetto è stata formulata da Depledge (1989): un organismo nel suo ambiente tende a mantenere l'omeostasi. Quando è esposto a contaminanti, quindi, diventano attivi i meccanismi compensatori e si ha un aumento o una riduzione in uno o più processi, funzioni fisiologiche o cambiamenti strutturali.

Ognuna di queste risposte può essere un *biomarker* e, come tale, indicare che è avvenuta l'esposizione. Se l'esposizione continua, o aumenta, i meccanismi compensatori dell'organismo vengono sopraffatti, insorge il danno e diventano attivi i meccanismi di riparazione fisiologica.

In condizioni naturali, quando un organismo procede attraverso queste fasi (omeostasi, risposta compensatrice, riparazione) l'energia richiesta per il normale mantenimento è ridotta, l'organismo diventa progressivamente più debole e suscettibile ed, eventualmente, potrà essere eliminato dalla popolazione.

Questo modello tiene conto degli stress naturali e da contaminanti multipli ai quali gli organismi sono esposti ed esprime l'esposizione cumulativa netta in termini di valutazione dello stato di salute generale dell'organismo (e della popolazione come un tutt'uno) (Shugart, 1995).

Nell'approccio multi-risposta, o multi-livello, lo scopo della misurazione dei biomarcatori non è tanto definire quantitativamente la dose di diversi agenti tossici alla quale un organismo è stato esposto, ma, piuttosto, determinare in che punto si trova la popolazione nel *continuum* tra la normale omeostasi e la malattia. L'uso simultaneo di una batteria di *biomarker*, disposti lungo la linea di allontanamento dalla risposta normale, offre, in questo caso, possibilità maggiori rispetto allo studio di un unico *biomarker* e mette a disposizione un precoce segnale d'allarme sulla pericolosità dell'esposizione ad un contaminante o ad una miscela di contaminanti. L'utilizzo di *biomarker* multipli può, inoltre, fornire informazioni sulla relazione esistente tra le varie risposte osservate e, quindi, sul meccanismo (o i meccanismi) d'azione tossica dei contaminanti presi in considerazione.

Il monitoraggio degli effetti biologici può, quindi, essere un utile strumento per valutare l'impatto sull'ambiente relativo ad esposizioni ripetute a uno o più contaminanti. Inoltre, i *biomarker* possono essere utilmente impiegati per valutare l'efficacia di interventi di recupero attivo di un ecosistema danneggiato; infatti, il successo di tali interventi può essere monitorato seguendo il ritorno delle risposte biologiche all'interno di valori basali predeterminati.

## ACCUMULO E BIOTRASFORMAZIONE

Gli ambienti acquatici, ed in particolare le aree marine costiere, gli ecosistemi salmastri e le acque interne, sono sottoposti ad un forte impatto legato ad una molteplicità di attività umane, tra le quali le produzioni industriali, l'agricoltura, l'urbanizzazione ed il turismo. Di fronte a questo scenario ed alla crescente richiesta di conciliare le esigenze dello sviluppo con la conservazione, appare chiara la rilevanza di estendere l'impiego delle tecniche basate su risposte biologiche, come strumento di valutazione della qualità dell'ambiente e di rafforzare il loro inserimento nella normativa in materia di gestione delle risorse naturali.

Da non sottovalutare è, poi, il possibile passaggio dei contaminanti accumulati in alcuni organismi all'uomo attraverso la catena alimentare, essendo nota e diffusa la pratica di posizionare impianti di acquacoltura (soprattutto mitilicoltura) nei porti o in aree ad essi vicine.

Tra le molte sostanze chimiche che si rinvencono negli ambienti acquatici le sostanze organiche, come i policlorobifenili (PCB), i pesticidi organo-clorurati (OCP), gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), i dibenzofurani policlorurati e le dibenzo-p-diossine policlorurate (PCDF e PCDD) sono considerati contaminanti persistenti (POP, *persistent organic pollutant*), cioè sostanze che permangono nell'ambiente, si accumulano attraverso la catena trofica e vengono trasportate anche a lunga distanza dai luoghi di emissione, costituendo un rischio per la salute ambientale ed umana. Il destino di questi composti idrofobici, nell'ecosistema acquatico, è determinato dal loro assorbimento da parte del particolato sospeso e del sedimento (van der Oost *et al.*, 1996a). I sedimenti, infatti, possono funzionare da compartimento di accumulo di contaminanti, in grado di rilasciarli nel lungo periodo, e riflettono, quindi, la storia degli scarichi in quell'area (Connor, 1984).

Le sostanze chimiche idrofobiche persistenti possono accumularsi negli organismi acquatici attraverso due meccanismi diversi:

- Bioconcentrazione: attraverso l'assunzione diretta dall'acqua
- Biomagnificazione: attraverso il consumo di cibo contaminato.

Gli xenobiotici lipofili possono entrare nella cellula per semplice diffusione attraverso la membrana plasmatica o attraverso endocitosi mediata da recettori in associazione con le lipoproteine a bassa densità (LDL) (Moore *et al.*, 1994). In più, la membrana plasmatica gioca un ruolo importante in diverse funzioni fisiologiche, non ultimi i processi di endo ed esocitosi che



regolano il trasporto di proteine ad altre macromolecole tra la cellula ed il suo ambiente extracellulare. Le perturbazioni di queste funzioni da parte di agenti chimici tossici possono avere profondi effetti sulla cellula e, quindi, sull'organo e sull'individuo.

Per esempio, il destino ed alcuni possibili effetti di contaminanti, nel fegato dei pesci, possono essere riassunti in due momenti, l'uno di attivazione dei sistemi enzimatici coinvolti nelle fasi successive (**VIA 1**) ed il secondo di detossicazione (**VIA 2**) (van der Oost *et al.*, 1996b) (Figura 1).

Nella via 1, gli xenobiotici, una volta all'interno della cellula, si legano al recettore citosolico degli idrocarburi arilici (Ah). Questo complesso recettore-induttore migra nel nucleo e si lega ad una sequenza (*enhancer*) del DNA a monte dei geni del citocromo P450 (CYP1A), conosciuta anche come elemento che risponde alla diossina (DRE). Il legame all'*enhancer* porta ad un aumento della trascrizione del gene CYP1A. Ciò risulterà nell'aumento della sintesi delle proteine del cit P450. Così come per il cit P450 1A, anche l'induzione della maggior parte degli enzimi della via 2 è regolata dal recettore Ah.

Nella via 2 i composti biodegradabili possono essere metabolizzati attraverso tre fasi:

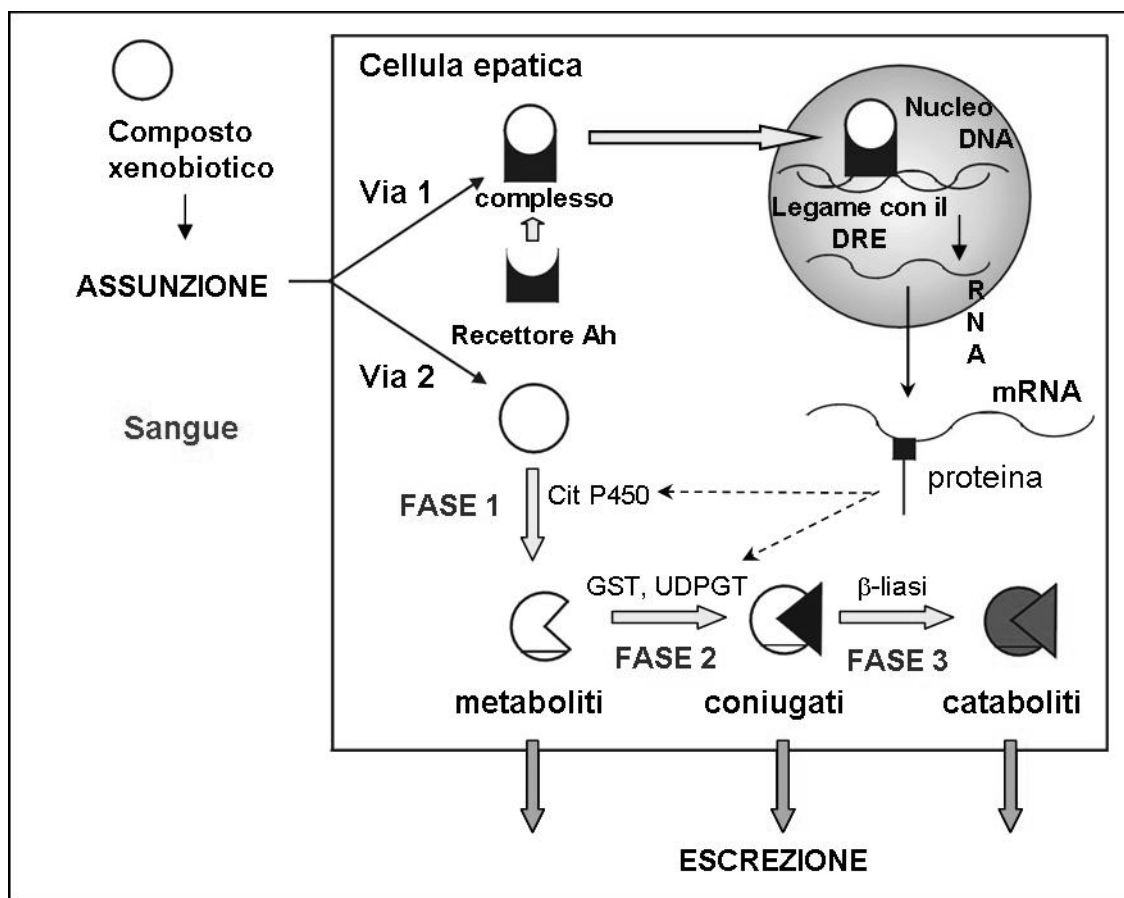
**Fase 1:** Alterazione, non sintetica, dell'originale molecola estranea tramite ossidazione, riduzione ed idrolisi. Queste reazioni sono catalizzate, per la maggior parte dei composti xenobiotici, dagli enzimi della monoossigenasi (MO) microsomiale come il citP450, il citocromo b<sub>5</sub> (cit b<sub>5</sub>) e la NADPH citocromo P450 reduttasi (P450 RED), che si trovano soprattutto nel reticolo endoplasmatico. Durante questo processo, alcuni contaminanti possono essere trasformati in metaboliti a volte più tossici del composto originale (attivazione metabolica) oppure si possono formare specie reattive dell'ossigeno (ROS), in grado di danneggiare importanti componenti cellulari come i lipidi, le proteine o il DNA.

**Fase 2:** La maggior parte degli enzimi di questa fase {la glutatione-S-transferasi (GST) e la UDP-glucuronil transferasi, (UDPGT)} catalizzano reazioni sintetiche di coniugazione, che facilitano l'escrezione dei prodotti delle reazioni della fase 1, con l'aggiunta di gruppi polari (per esempio il glutatione, GSH, e l'acido glucuronico, UDP-GA) alla molecola.

**Fase 3:** Gli enzimi di questa fase (peptidasi, liasi,  $\beta$ -liasi, ecc) catalizzano reazioni cataboliche dei metaboliti coniugati, per formare prodotti facilmente eliminabili attraverso l'escrezione.

La tossicità finale di ogni specifico composto xenobiotico è correlata allo stato di induzione degli enzimi delle fasi 1 e 2 e all'equilibrio tra le reazioni di attivazione metabolica e detossicazione, cioè l'equilibrio tra la formazione di metaboliti tossici e non tossici. Se le capacità degli enzimi della fase 2 è insufficiente a coniugare i metaboliti tossici, formati dalle reazioni di biotrasformazione della fase 1, si possono verificare effetti nocivi. Molti metaboliti reattivi sono, infatti, capaci di legarsi a macromolecole di grande importanza biologica come le proteine di membrana e il DNA, causando danno cellulare ed effetti mutageni (Wiston e Di Giulio, 1991; Van Welie *et al.*, 1992). Poiché l'induzione degli enzimi della fase 2, di solito, è

minore rispetto a quella del cit P450, la velocità di rimozione dei metaboliti tossici può essere ridotta rispetto al loro tasso di formazione attraverso le reazioni ossidative (Hodgson, 1994).



**Figura 1.** Rappresentazione semplificata del destino di composti xenobiotici nelle cellule del fegato. Via 1, un possibile meccanismo per l'induzione enzimatica; Via 2, un possibile meccanismo per la detossificazione o l'attivazione di derivati tossici. DRE, elementi che rispondono alla diossina; Cit P450, isoenzimi del citocromo P 450; GST, glutatione-S-transferasi; UDPGT, UDP glucoronil transferasi. (Modificato dall'originale di Van der Oost *et al.*, 1996).

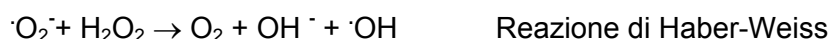
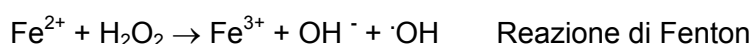
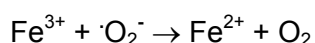
## STRESS OSSIDATIVO

Diversi contaminanti ambientali, o i loro metaboliti possono, inoltre, esercitare effetti tossici attraverso il meccanismo dello stress ossidativo (Wiston e Di Giulio, 1991). Per esempio, alcune sostanze, come gli IPA (idrocarburi policiclici aromatici), i composti nitroaromatici e i metalli di transizione, vanno incontro a cicli *redox* ed inducono l'aumento dei livelli cellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS), come il radicale superossido ( $O_2^{\cdot-}$ ), il radicale idrossilico ( $\cdot OH$ ) o il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ). Quindi, tali contaminanti possono aumentare la formazione di radicali dell'ossigeno attraverso meccanismi sia diretti che indiretti, che includono

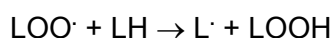
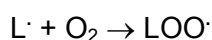
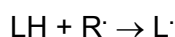
la reazione di Fenton, l'induzione dell'attività e l'autoossidazione del citocromo P450, la destabilizzazione dei sistemi di membrana e l'alterazione della catena mitocondriale di trasporto degli elettroni (Livingstone, 2001).

Variazioni dell'equilibrio *redox* della cellula possono essere determinate, negli organismi acquatici, anche da fattori naturali, come il livello d'ossigeno disciolto, la temperatura e la radiazione ultravioletta.

Specie reattive dell'ossigeno vengono prodotte anche attraverso il normale metabolismo cellulare e la loro velocità di formazione è proporzionale al consumo di ossigeno ed alla percentuale di mitocondri nei tessuti. Il pericolo dell'aumentato livello di  $H_2O_2$  e  $\cdot O_2^-$  è legato alla capacità, di questi ROS, di essere rapidamente trasformati nel radicale idrossilico ( $\cdot OH$ ), in grado di danneggiare, in diversi modi, le macromolecole cellulari (Storey, 1996). *In vivo*, la maggior parte del radicale  $\cdot OH$  si forma dalla riduzione del  $H_2O_2$  da parte dell'anione superossido (reazione di Haber-Weiss), un processo in due fasi che è catalizzato da metalli di transizione ( $Fe^{3+}$  e  $Cu^{3+}$ ) e coinvolge la reazione di Fenton:



Tutte i componenti cellulari sono soggetti all'attacco dei ROS, in particolare del  $\cdot OH$ . L'attacco alle proteine può, per esempio, modificarne gli aminoacidi o ossidare i gruppi sulfidrilici e, quindi, portare a cambiamenti conformazionali, oppure ad un'alterata attività enzimatica ed ad un aumento della suscettibilità alla proteolisi (Stadman, 1992; Sies, 1993). I ROS possono anche danneggiare il DNA modificandone le basi, ossidandole, o provocando rotture nell'ossatura zucchero-fosfato. Gli acidi grassi polinsaturi, contenuti nelle membrane, come quello arachidonico, sono particolarmente suscettibili all'attacco da parte dei radicali liberi. La rimozione di un atomo di idrogeno da un gruppo  $-CH_2-$  da parte di un radicale (di solito  $\cdot OH$ ) porta alla formazione di un radicale lipidico (tipicamente un diene coniugato), che può reagire con l'ossigeno per dare un radicale perossilipidico ( $LOO\cdot$ ). Questo può, a sua volta, estrarre un atomo di H da una catena di acidi grassi adiacente e dare inizio ad un cascata di reazioni, che convertono altri lipidi di membrana in lipidi idroperossidi (L-OOH).



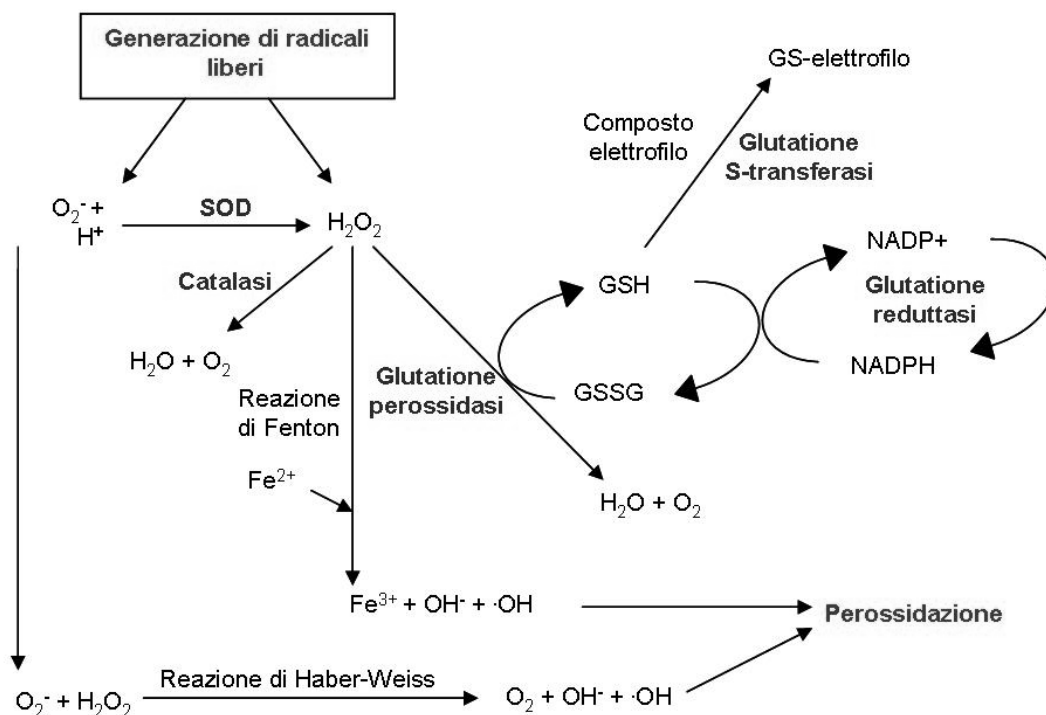
Questo processo viene detto perossidazione lipidica ed è una delle principali cause della perdita di funzioni cellulari in condizioni di stress ossidativo. Infatti la presenza di L-OOH in una membrana può compromettere la sua funzionalità alterandone la fluidità e permettendo a ioni

come il  $\text{Ca}^{2+}$  di passarle liberamente attraverso. Ciò può comportare l'attivazione di fosfolipasi e proteasi calcio-dipendenti ed, eventualmente, anche la rottura della membrana stessa (Halliwell, 1992).

A causa dell'elevata pericolosità delle specie reattive dell'ossigeno, le cellule hanno evoluto dei meccanismi antiossidanti atti a prevenire la loro formazione ed eliminare quelli eventualmente formati, grazie alla presenza di molecole *scavenger* o di enzimi antiossidanti (Storey, 1996). Gli antiossidanti non enzimatici includono il glutathione (GSH), l'acido ascorbico, l' $\alpha$ -tocoferolo (vit. E), il  $\beta$  – carotene e l'acido urico. Il glutathione è un tripeptide estremamente importante per la salute della cellula e svolge diverse funzioni: è il substrato di alcuni enzimi antiossidanti, svolge un'azione di *scavenger* contro i radicali idrossilici e l'ossigeno singoletto, ed ha anche un ruolo nella rigenerazione della vitamina E (Reddy *et al.*, 1982). Il rapporto fra il glutathione ridotto e quello ossidato (GSH/GSSG) nella cellula, perciò, è un buon indicatore di stress ossidativo.

Il sistema di difesa, poi, ha evoluto una batteria d'enzimi atti a combattere la formazione dei radicali dell'ossigeno, tra i quali la superossido dismutasi (SOD), che trasforma l'anione superossido in perossido d'idrogeno, la catalasi (CAT), che metabolizza il  $\text{H}_2\text{O}_2$  ad ossigeno molecolare ed acqua, o la perossidasi-glutathione-dipendente (GPOX), che riduce il  $\text{H}_2\text{O}_2$  ad acqua con la contemporanea ossidazione del glutathione ridotto (GSH). L'attività sia degli enzimi della via 2 sia degli enzimi antiossidanti costituisce, potenzialmente, un utile *biomarker* nelle valutazioni della qualità di ambienti acquatici, che utilizzano, come bioindicatori, specie ittiche.

Sono stati sviluppati alcuni metodi in grado di quantificare la capacità, di diversi campioni biologici, di neutralizzare i ROS e di fornire un indice di resistenza (o suscettibilità) allo stress ossidativo. Tra questi, la tecnica, nota come *Total Oxyradical Scavenging Assay* (TOSCA), è in grado di valutare la resistenza totale fornita dal sistema antiossidante globale nei confronti di specifici ROS (Regoli *et al.*, 1999). Il metodo TOSCA è basato sulla reazione tra diverse forme di radicali dell'ossigeno e l'acido  $\alpha$ -cheto- $\gamma$ -metiolbutirrico (KMBA), che viene ossidato a gas etilene. In presenza di antiossidanti cellulari, questi competono con il KMBA per i radicali dell'ossigeno, generati artificialmente, e la produzione di etilene è inibita quantitativamente. La cinetica di formazione dell'etilene durante il test è monitorata mediante analisi cromatografiche e la capacità antiossidante di un campione è calcolata in base alla sua abilità nell'inibire la formazione di etilene, rispetto ai controlli (solo ROS e KMBA). Ad ogni campione viene quindi attribuito un valore sperimentale TOSC che varia da 0 a 100 ed indica, rispettivamente, assenza di inibizione della formazione di etilene e massima capacità antiossidante con assenza di ossidazione del KMBA.



**Figura 2.** Principali vie di formazione dei ROS ed azione degli enzimi coinvolti nelle difese cellulari antiossidanti (modificato dall'originale di Storey, 1996)

## LISOSOMI

Come già accennato, le cellule sono capaci di sopravvivere a molti tipi di danno cellulare, grazie ad una serie di risposte molecolari, biochimiche e strutturali.

Molte di queste risposte coinvolgono alterazioni funzionali e strutturali delle membrane intracellulari, e, in particolar modo, di quelle del sistema lisosomale.

Un lisosoma è una vescicola contenente enzimi idrolitici acidi. È formato dalla fusione di vescicole idrolasiche del Golgi con endosomi. Nelle vescicole idrolasiche del Golgi (o lisosomi primari) sono già presenti gli enzimi litici, ma il pH non è sufficientemente acido perché questi si attivino. Quando queste si fondono con gli endosomi, dotati di pompe protoniche sulla propria membrana, gli enzimi vengono attivati e si forma il vero e proprio lisosoma.

I lisosomi sono ricchi di enzimi digestivi in grado di degradare molecole e strutture presenti all'interno della cellula nei loro costituenti elementari per poi, quando possibile, venire riutilizzati in altro modo o essere espulsi.

I lisosomi vengono impiegati sia nella fagocitosi di materiale estraneo che nel riciclaggio di componenti citoplasmatici all'interno della cellula durante i normali processi di mantenimento e riparazione intracellulare, infatti, possono degradare macromolecole come proteine, lipidi e carboidrati o anche molecole estranee ingerite dalla cellula. La fagocitosi (ma anche

l'autofagocitosi) prevede la combinazione del materiale da fagocitare con il lisosoma primario. Dall'unione del lisosoma primario con il materiale da fagocitare prende vita il cosiddetto lisosoma secondario.

I lisosomi possiedono la capacità di accumulare diversi metalli e contaminanti organici tossici (Moore, 1990). Il loro ruolo li espone, quindi, a particolari situazioni di vulnerabilità nei confronti di alcuni xenobiotici. Ciò, in determinate circostanze, può portare al danneggiamento del lisosoma stesso. In questi casi la cellula va incontro a degenerazione o morte per eccessiva o incompleta autofagia, deficit ereditario di uno degli enzimi dei lisosomi primari, incapacità dei fagolisosomi di degradare il materiale fagocitato, liberazione ed attivazione di enzimi lisosomali.

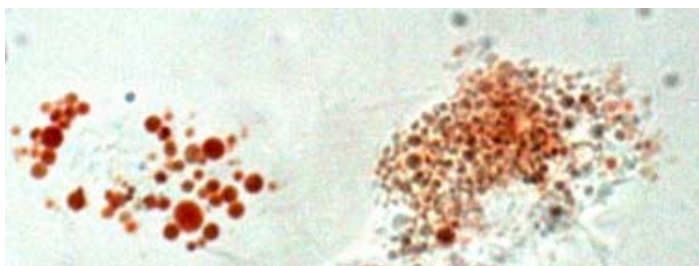
Le risposte lisosomali all'esposizione a xenobiotici, o, più in generale allo stress ambientale, si dividono essenzialmente in tre categorie: un aumento nelle dimensioni dei lisosomi, una riduzione della stabilità di membrana, cambiamenti nel contenuto dei lisosomi.

Diverse fonti di stress ambientale (inquinamento chimico, cambiamenti nella salinità, temperature elevate, malnutrizione, stress riproduttivo) possono provocare un aumento nelle dimensioni dei lisosomi della ghiandola digestiva dei molluschi (Marigómez *et al.*, 1989, 1991, Regoli, 1992). Questo aumento sia in volume che in superficie delle dimensioni dei lisosomi secondari può essere dovuto ad un aumento dei fenomeni di fusione tra vacuoli e di autofagia. Queste alterazioni sono a volte accompagnate da un aumento nel catabolismo delle proteine e della formazione di peptidi e aminoacidi all'interno del compartimento lisosomale (Moore, 1988). Inoltre, è stato ampiamente dimostrato che gli stress ambientali possono ridurre la stabilità delle membrane lisosomali, misurata, di solito, in termini di ridotto tempo di ritenzione di un colorante vitale come il rosso neutro. (Moore 1988, Wiston *et al.*, 1991, Cajaraville *et al.*, 1995, Nicholson 1999, Lowe and Fossato, 2000).

#### Tempo di ritenzione del rosso neutro

Nel 1984 Borenfreund e Puerner pubblicarono una metodica che utilizzava come indicatore di danno cellulare le alterazioni nella capacità della cellula di assumere il colorante rosso neutro: le cellule sane avrebbero dovuto assumere e trattenere più a lungo una quantità maggiore di colorante rispetto a quelle danneggiate. Questa metodica comportava l'esposizione delle cellule ad un mezzo da testare, e quindi la loro incubazione in un a soluzione di rosso neutro. Dopo l'incubazione il colorante accumulato dalle cellule veniva estratto e misurato spettrofotometricamente.

Se il colorante poteva essere misurato con uno spettrofotometro era ragionevole ritenere che potesse anche essere visualizzato con un microscopio ottico. In questo caso sarebbe stato possibile monitorare e quantificare il progresso del rosso neutro all'interno della cellula, e , nel caso di cellule danneggiate, la sua successiva fuoriuscita nel citosol, utilizzando il tempo di ritenzione del colorante come misura del danno cellulare. Questa è la metodica comunemente più utilizzata ( Lowe *et al.*, 1992, Lowe e Pipe, 1994, Lowe *et al.*, 1995a, Lowe *et al* 1995b).



**Figura 3.** Emociti di *Mitylus galloprovincialis* colorati con il rosso neutro.

### Accumulo di lipofuscina

A seguito dell'esposizione a diversi contaminanti sono stati osservati cambiamenti nel contenuto di lipofuscina, lipidi neutri e metallotioneine (Moore 1988). L'accumulo di lipofuscina sembra costituire una risposta generale allo stress ambientale (Viarengo *et al.*, 1990, Regoli 1992), mentre quello di lipidi neutri sembra più strettamente correlata all'esposizione a contaminanti organici (Moore 1988, Domouhtsidou e Dimitriadis 2001).

La lipofuscina è una sostanza polimerica intralisosomale autofluorescente ed elettrocondensa, costituita principalmente da residui di proteine e lipidi (30 – 70% e 20 – 50% rispettivamente). La componente proteica è scarsamente caratterizzata con un contenuto variabile in aminoacidi, mentre i costituenti lipidici includono trigliceridi, acidi grassi liberi, colesterolo, fosfolipidi, dolicoles e dolicoles fosforilati. I carboidrati contribuiscono alla sua composizione per il 4 – 7% (Terman e Brunk 1998). Inoltre, all'interno dei granuli di lipofuscina sono stati rinvenuti considerevoli quantità di metalli, specialmente ferro (Brun e Brunk 1970, Jolly *et al.*, 1995).

La lipofuscina viene anche chiamata *age pigment*, o pigmento dell'età ed è considerata un indicatore di invecchiamento. Questo non solo perché la sua quantità aumenta con l'età, ma anche e soprattutto perché correla negativamente con la longevità (Munnell e Getty, 1968, Nakano e Gotoh 1992, Hosokawa *et al.*, 1994, Sheehy *et al.*, 1995).

Sebbene le cellule rinnovino continuamente i componenti vecchi o danneggiati, la quantità di strutture inutili e/o scarsamente funzionanti aumenta con l'età, in particolar modo nelle cellule post mitotiche (per esempio neuroni, miociti cardiaci e fibre muscolari scheletriche) (Terman 2001). Queste strutture, che includono macromolecole alterate, mitocondri danneggiati ed altri organuli, così come la lipofuscina stessa, possono essere considerati rifiuti biologici. Quindi la lipofuscina può essere considerata un materiale di rifiuto morfologicamente e chimicamente polimorfo originatosi da una varietà di strutture intracellulari, che si accumula nel sito primario di smaltimento rifiuti: il lisosoma.

Le vie attraverso le quali il materiale citoplasmatico entra nel compartimento lisosomale sono diverse. Porzioni di citoplasma (che spesso contengono interi organuli, come i mitocondri) entrano nei lisosomi attraverso la macroautofagocitosi, che implica il sequestro di porzioni di

citoplasma attraverso la formazione di autofagosomi, la loro fusione con i lisosomi, e la successiva degradazione del materiale contenuto da parte degli enzimi lisosomali. Componenti citoplasmatici minori, soprattutto macromolecole, possono entrare attraverso microautofagocitosi, attraverso cioè l'invaginazione della membrana lisosomale, o attraverso autofagocitosi selettiva.

Poiché non è degradabile e non può essere rimossa dalla cellula attraverso processi di esocitosi, la lipofuscina si accumula inevitabilmente all'interno dei lisosomi delle cellule post mitotiche o che si dividono lentamente, mentre le cellule mitoticamente attive riescono a diluirla abbastanza efficientemente durante la divisione (Terman 2001).

Sono state fornite diverse prove del fatto che lo stress ossidativo promuova la formazione della lipofuscina mentre le difese antiossidanti la combattano (Terman e Brunk 1998, Zs-Nagy *et al.*, 1995). Questi dati suggeriscono che l'ossidazione renda i componenti cellulari indigeribili da parte degli enzimi lisosomali e suggeriscono anche un legame tra il meccanismo di formazione della lipofuscina e la teoria sull'invecchiamento provocato da radicali liberi di Harman (Harman 1956). La formazione di legami crociati (*cross-linking*) tra le proteine ed altre biomolecole è uno dei più tipici effetti dell'attacco da parte di ROS ed una delle più probabili cause della scarsa degradabilità del materiale autofagocitato (Kikugawa *et al.*, 1989).

In teoria, sostanze non degradabili possono formarsi in qualsiasi compartimento cellulare, anche se il sito più probabile di tale formazione è all'interno del lisosoma stesso. I ROS (principalmente il  $H_2O_2$  prodotto nei mitocondri) diffondono facilmente all'interno dei lisosomi, che contengono diverse macromolecole fagocitate in via di degradazione così come ferro a basso peso molecolare redox attivo. Quest'ultimo può essere rilasciato dalle metallotioneine durante la loro degradazione all'interno dei lisosomi. L'interazione tra il perossido di idrogeno ed il ferro può portare alla formazione di  $\cdot OH$  (o di altre specie radicaliche altamente reattive), che può causare il *cross-linking* delle macromolecole circostanti e, quindi, la formazione di lipofuscina (Brunk *et al.*, 1992).

A sostegno di ciò, l'effetto dello stress ossidativo sulla formazione della lipofuscina viene drammaticamente aumentato dall'inibizione delle proteasi lisosomali, cosa che ritarda la degradazione del materiale fagocitato e concede più tempo per la sua ossidazione (Terman e Brunk 1998).

L'autofagocitosi dei mitocondri sembra essere uno dei maggiori responsabili della formazione della lipofuscina (Collins *et al.*, 1980). I mitocondri sono il principale sito di formazione dei ROS ed anche il loro principale bersaglio. I mitocondri danneggiati dallo stress ossidativo possono contenere già al loro interno macromolecole perossidate non degradabili. Inoltre tali mitocondri possono generare una quantità maggiore di  $\cdot O_2^-$  rispetto ai mitocondri funzionali. Nei lisosomi tale produzione può continuare.



Poiché la lipofusina è separata dal resto del citoplasma dalla membrana lisosomale, non può interagire direttamente con componenti extralisosomali. Comunque un'aumentata quantità di ferro all'interno dei granuli di lipofusina può promuovere la formazione di specie reattive dell'ossigeno, rendendo la cellula suscettibile al danno ossidativo attraverso la destabilizzazione dei lisosomi. Inoltre un grande numero di lisosomi contenenti lipofusina, che contengono anche idrolasi attive, può promuovere il danno cellulare attraverso la destabilizzazione delle membrane lisosomali (causata da diversi fattori, tra cui lo stress ossidativo stesso), che porta alla fuoriuscita di enzimi idrolitici nel citosol. A supporto di questo, fibroblasti ricchi di lipofusina si sono dimostrati più suscettibili all'apoptosi indotta dallo stress ossidativo rispetto a cellule con basso contenuto di lipofusina (Terman *et al.*, 1999).

Come per tutte le funzioni cellulari, la capacità di produrre enzimi lisosomali per la fagocitosi non è illimitata, e lo sforzo di digerire grandi quantità di lipofusina, accumulata all'interno di numerosi lisosomi secondari, può risultare nel fallimento delle funzioni essenziali dei lisosomi, come l'autofagocitosi.

Una ridotta autofagocitosi può influenzare la riparazione cellulare, un processo, in genere, associato alla continua degradazione intralisosomale dei componenti cellulari danneggiati ed il loro rimpiazzo da parte di elementi di nuova sintesi.

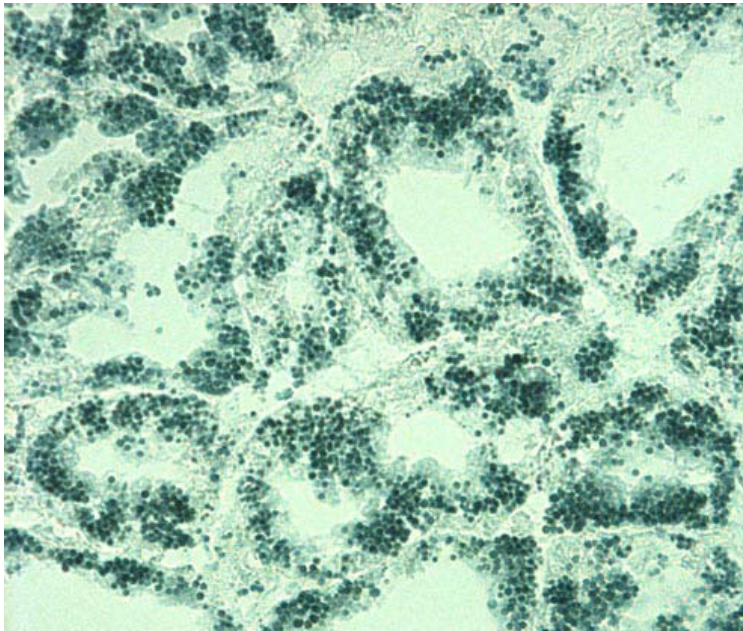
A questo proposito, un rinnovamento insufficiente dei mitocondri potrebbe avere conseguenze più serie perché questi organuli sono vulnerabili alla loro stessa produzione di  $\cdot\text{O}_2^-$ . La perdita di mitocondri normali può portare ad una diminuzione nella produzione di ATP, e l'accumulo di mitocondri danneggiati può essere causa di ulteriore danno ossidativo, dato che, come detto, essi generano molti più ROS dei mitocondri sani (Beckman e Ames 1998).

I mitocondri danneggiati, a loro volta, potrebbero causare un'aumentata sintesi di lipofusina, suggerendo che nelle cellule postmitotiche alterazioni dei mitocondri e dei lisosomi possano amplificarsi l'un l'altro.

Dalla letteratura sull'argomento, sembra chiaro che il deposito in gran quantità di lipofusina possa rendere, in definitiva, la cellula più suscettibile allo stress ossidativo, diminuisca la degradazione all'interno dei lisosomi, nonostante l'abbondanza di enzimi lisosomali, ed, eventualmente, riduca l'adattabilità della cellula e favorisca la comparsa di varie patologie legate all'invecchiamento. Tali cambiamenti sono caratteristici, per esempio, delle malattie neurodegenerative come il morbo di Parkinson e l'Alzheimer. Ciò è confermato dal fatto che sia lo stress ossidativo (Beal 1996) sia la riduzione dei processi di degradazione all'interno dei lisosomi (Bi *et al.*, 1999) sono implicati nella patogenesi di queste malattie degenerative. Ad ulteriore conferma una grande quantità di lipofusina e di enzimi lisosomali sono stati osservati in cellule nervose contenenti sostanza amiloide in malati di Alzheimer (Adamec *et al.*, 2000), suggerendo che la formazione di sostanza amiloide possa essere una conseguenza della

progressiva riduzione della funzionalità dei lisosomi, che porta all'accumulo di materiale non degradabile.

In conclusione, la formazione e l'accumulo di lipofuscina sembra portare ad una varietà di difetti nelle funzioni cellulari e nell'omeostasi. La natura non degradabile di questo materiale è associata ad una diminuzione della funzionalità lisosomale, che, come effetto secondario, influenza diverse attività cellulari.



**Figura 4.** Tubuli digestivi di *M. galloprovincialis*, che mostrano un abbondante contenuto di lipofuscina (granuli verdi).

## GENOTOSSICITA'

Molti composti rilasciati nell'ambiente sono potenzialmente genotossici, in grado, cioè, di interagire con il materiale genetico, direttamente o a seguito di attivazione metabolica, modificandolo. Il metabolismo cellulare delle sostanze genotossiche è un fenomeno relativamente complesso e la mancanza di una detossicazione completa può portare alla formazione di metaboliti elettrofili altamente reattivi, che possono attaccare i centri nucleofili in macromolecole come DNA, lipidi, proteine.

L'interazione con il DNA si manifesta primariamente attraverso alterazioni strutturali della molecola di acido desossiribonucleico che possono manifestarsi come addotti, alterazione chimica delle basi azotate, legami crociati e rotture a livello di singolo e doppio filamento (*strand breaks*). Tali alterazioni, di solito, vengono prontamente corrette da meccanismi cellulari di riparazione, senza conseguenze dannose per l'organismo.

Tuttavia le lesioni che non vengono riparate o sono processate in modo improprio, possono portare alla fissazione di anomalie del materiale genetico come aberrazioni cromosomiche, mutazioni geniche ed altri effetti a lungo termine come il cancro nei vertebrati, uomo compreso.

Inoltre, le genotossine possono colpire le cellule della linea germinale e, quindi, possono essere causa di difetti ereditabili. Numerosi eventi mutageni sono stati correlati con riduzioni della *fitness* darwiniana degli organismi, fatto importante se si considera che, a livello di popolazione, gli effetti sulla riproduzione possono essere più rilevanti di quelli cancerogeni.

Kurelec (1993) ha introdotto il termine di “*genotoxic disease syndrome*” per definire l’insieme di alterazioni indotte in invertebrati e vertebrati dall’esposizione ambientale a composti genotossici, anche in organi ed organismi che non sviluppano il cancro. Tali effetti negativi comprendono squilibri delle funzioni enzimatiche, alterato *turnover* delle proteine, squilibri nel metabolismo generale, produzione di promotori di danno citotossico, inibizione della crescita, processi degenerativi ed atrofie in tessuti ed organi, invecchiamento precoce, sia cellulare che dell’organismo, riduzione della *fitness*, aumentata frequenza di malattie, riduzione delle capacità riproduttive e di adattamento, e possono ridurre la sopravvivenza di una popolazione fino alle estreme conseguenze (estinzione).

Da quanto detto appare chiaro che l’esposizione a genotossine può provocare una cascata di eventi in grado di cambiare l’integrità del DNA e risultare in vari tipi di danno. L’identificazione e la quantificazione dei vari eventi, nella sequenza dall’esposizione alla fissazione del danno genetico, possono essere utilizzate come *biomarker* in organismi esposti ad ambienti contaminati.

### **Rotture del DNA**

La determinazione quantitativa della presenza di rotture nella doppia elica (*strand breaks*, SB) viene frequentemente utilizzata per valutare l’effetto genotossico di contaminanti ambientali. Infatti la produzione di SB è correlata con le proprietà mutagene e cancerogene di numerose sostanze con strutture diverse. Sono dunque state investite energie per determinare i meccanismi che portano alla formazione di SB e l’applicabilità della loro misurazione come *biomarker* (Mitchelmore e Chipman, 1998).

*Strand breaks* sia a livello di singolo che di doppio filamento possono essere prodotti attraverso diversi meccanismi. Oltre alla produzione diretta ad opera, per esempio, delle radiazioni ionizzanti, SB possono essere prodotti anche attraverso l’azione di taglio degli enzimi di riparazione. Inoltre, è stato dimostrato che, in vari tipi cellulari isolati da diversi organismi, DNA SB sono indotti da una serie di sostanze che agiscono sia direttamente (senza la necessità di un’attivazione metabolica), come il perossido d’idrogeno, sia non direttamente (attraverso l’attivazione metabolica), come il benzo-a-pirene (BaP).

Quindi, la misurazione degli SB offre un mezzo per valutare l'effetto genotossico di un'ampia serie di composti, che possono modificare il DNA in modi diversi.

Comunque, gli SB possono essere prodotti anche attraverso meccanismi non direttamente correlati alla genotossicità di un agente chimico, per esempio, in condizioni naturali, l'incremento nei livelli di reagenti endogeni come il radicale superossido o l'ossido d'azoto (Meneghini 1988; Epe, 1995) oppure l'attivazione di enzimi come la topoisomerasi e l'endonucleasi (McConkey *et al.*, 1988).

La non specificità dei test che rilevano gli SB insieme all'alta sensibilità e applicabilità a diversi tipi cellulari, possono essere considerate caratteristiche utili nel monitoraggio ambientale, pur rendendosi necessario un approfondimento delle cause dell'effetto osservato (Mitchelmore e Chipman, 1998).

La maggior parte delle analisi per gli SB si basa sul principio secondo il quale la percentuale di DNA a singolo filamento che si separa dalla doppia elica, ad un pH elevato, è proporzionale al numero di SB nella molecola di DNA. In queste condizioni, i siti labili agli alcali, come siti caratterizzati dalla presenza di addotti, vengono solitamente convertiti in SB (Shugart, 1994).

Per lo studio degli SB sono stati utilizzati vari approcci sperimentali. Le tecniche di **sedimentazione neutra od alcalina** (Lett, 1981) si basano sulla sedimentazione differenziale dei filamenti di DNA tagliati, attraverso un gradiente di saccarosio e, sebbene efficaci, sono tecniche lunghe e non così sensibili come l'eluizione alcalina o il *Comet Assay*. La **nucleoid sedimentation** (Cook e Brazell, 1978) sfrutta il rilassamento delle strutture nucleoidi (strutture rilasciate da una leggera lisi di cellule contenenti DNA superavvolto) in presenza di SB, ma ha le stesse limitazioni delle altre tecniche di sedimentazione.

Nell'**eluizione alcalina** (Blakely *et al.*, 1982) e **neutra** il DNA denaturato è fatto fluire attraverso un filtro poroso; queste tecniche sono in grado di evidenziare rotture sia a livello di singolo che di doppio filamento e permettono la valutazione del danno al DNA in qualsiasi popolazione cellulare.

L'analisi fluorimetrica del DNA *unwinding* (**FADU**) è stata introdotta da Birnboim e Jevcak (1981) sulla base di precedenti lavori, che avevano dimostrato come la separazione dei due filamenti del DNA avvenga in condizioni alcaline, a causa della rottura dei legami idrogeno tra i due filamenti della doppia elica (Ahnstrom ed Erixon, 1973). Questo metodo sembra capace di individuare SB a livello di un taglio per cromosoma e presentare una sensibilità simile a quella dell'eluizione alcalina. Tuttavia, i dati che ne risultano non forniscono alcuna informazione circa la distribuzione del danno all'interno di una popolazione di cellule.

La **gel elettroforesi** rappresenta un'ulteriore tecnica analitica per la valutazione quantitativa degli SB nel monitoraggio ambientale, che può consentire la misura del danno genetico su singola cellula. Sotto condizioni alcaline, l'elettroforesi del DNA su gel di agarosio, risulta in una

migrazione dei frammenti di DNA denaturato, all'interno di questo gel, che dipende dalle dimensioni dei frammenti. I preparati vengono colorati con bromuro di etidio ed analizzati al microscopio a fluorescenza. Le tipiche immagini a cometa che si ottengono con questa metodica giustificano il nome di **Comet Assay**.

#### Comet assay

Rydberg e Johanson (1978) realizzarono la prima quantificazione di danno al DNA in singole cellule, incluse in agarosio su vetrini da microscopia e lisate in condizioni moderatamente alcaline. Dopo la neutralizzazione, le cellule erano colorate con arancio di acridina e l'entità del danno al DNA quantificato attraverso la misura del rapporto tra la fluorescenza verde (indicante il DNA a doppio filamento) e quella rossa (DNA a singolo filamento).

Nel 1984 Östling e Johanson descrissero una procedura microelettroforetica per la visualizzazione diretta del danno al DNA in singole cellule. Cellule di mammifero sospese in un sottile gel di agarosio su un vetrino da microscopia, venivano lisate con detergenti e sali ad alte concentrazioni, sottoposte ad elettroforesi, in condizioni neutre, e colorate con bromuro di etidio. Il grado di frammentazione del DNA era valutato mediante la misura della migrazione dei frammenti di DNA dal nucleo verso l'anodo. Le immagini risultanti furono chiamate comete per il loro aspetto (figura 5).

Le condizioni neutre, per la lisi e l'elettroforesi, però, permettevano di individuare i tagli solo a livello di doppio filamento, ma non consentivano di rilevare i tagli a livello di singolo filamento. Dal momento che gli agenti genotossici, generalmente, inducono quantità di rotture monocatenarie e siti labili agli alcali molto superiori rispetto alle rotture bicatenarie (Tice, 1995), è chiaro che le condizioni neutre possono fornire solo un quadro parziale del danno al DNA.

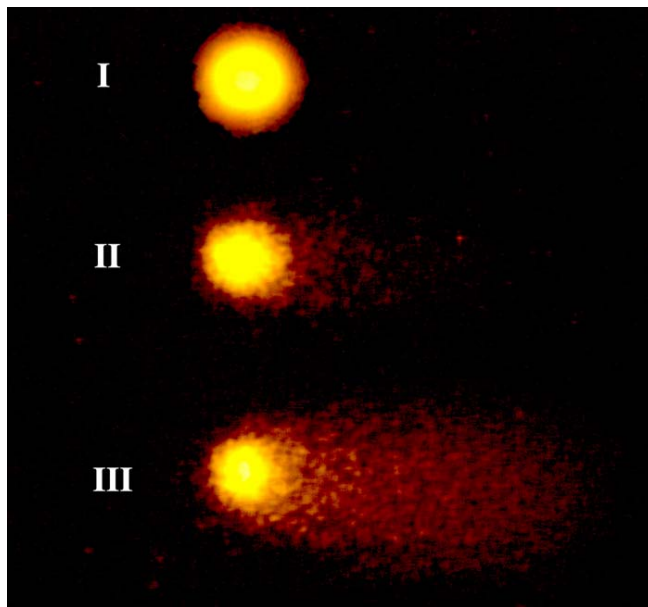
Singh *et al.* (1988) modificarono questa tecnica, introducendo l'utilizzo di condizioni alcaline per enfatizzare la presenza di tagli a livello di singolo filamento. La versione modificata da Singh *et al.* (1988) è quella più diffusamente applicata ed è nota come *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE) o **Comet Assay**. Lo sviluppo di vari programmi d'analisi d'immagine ha, inoltre, permesso di velocizzare la quantificazione di alcuni parametri della cometa, come la percentuale di DNA migrato dal nucleo verso l'anodo, la lunghezza della coda della cometa ed il *tail moment* (prodotto tra l'intensità della fluorescenza nella coda e la lunghezza della coda).

Il test della cometa è stato descritto come un metodo molto sensibile (individua un taglio ogni  $1 \times 10^{10}$  Da) (Gedik *et al.*, 1992), può essere effettuato con un numero estremamente esiguo di cellule nucleate di ogni tipo, animali e vegetali (Koppen e Verschave, 1996) e in tempi relativamente brevi.

Nonostante ciò, ci sono diverse limitazioni pratiche riguardanti l'applicabilità di questo test, che includono la difficoltà nel distinguere tra SB, che si verificano a seguito di un'esposizione da quelli dovuti al normale metabolismo (per esempio a seguito di un aumento di specie

radicaliche) e la possibilità che si abbia riparazione degli SB prima dell'analisi; perciò è importante la scelta dei controlli e delle condizioni sperimentali.

L'inclusione di un inibitore della riparazione del DNA, come la citosina- $\beta$ -D-arabinofuranoside, un inibitore della DNA polimerasi e ligasi, potrebbe superare questa limitazione (Park *et al.*, 1991). Comunque, se comparate con le cellule di mammifero, la riparazione del DNA negli organismi acquatici è lenta (Walton *et al.*, 1984; Maccubin, 1994; Espina e Weiss, 1995), ciò potrebbe essere utile per misurare SB indotti in modo diretto, ma potrebbe diminuire la sensibilità del test per composti che formano SB via addotti.



**Figura 5.** Comet assay, immagini di comete: nucleo con DNA non danneggiato (I); nuclei con DNA frammentato che è migrato verso l'anodo (II, III).

### **Micronuclei**

I micronuclei si possono formare nelle cellule a seguito di un'anomala divisione mitotica in cui si verifica la perdita di uno o più frammenti cromosomici acentrici (privi di centromero), che rimangono indietro all'anafase e, quindi, non vengono inclusi nel nucleo principale, quando questo viene formato. Micronuclei possono essere formati anche da un cromosoma intero.

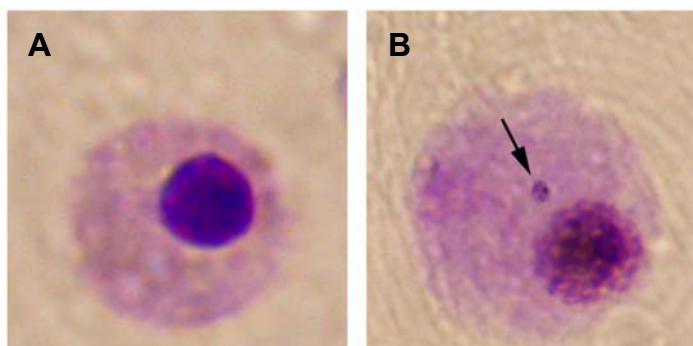
In entrambi i casi si osservano come piccole porzioni di cromatina al di fuori del nucleo principale di una cellula, circondate da membrana nucleare, (Evans, 1997). Questa ha lo scopo di proteggere il contenuto dei micronuclei nel citosol e di permettere la replicazione e la trascrizione del DNA micronucleare, che avviene in sincrono con quella del DNA della cellula madre.

La comparsa di micronuclei, contenenti cromosomi interi, è dovuta principalmente a mutazioni nelle proteine del cinetocore o ad anomalie dell'apparato mitotico (Fenech, 1993), oppure ad alterazioni della fisiologia cellulare (Albertini *et al.*, 2000),

I frammenti acentrici, invece, possono essere dovuti a rotture, indotte da mutageni esogeni ed endogeni, delle due eliche del DNA, che non sono state riparate (Fenech, 1993), oppure alla replicazione di DNA danneggiato.

Il **test del micronucleo** (Schmid, 1975) permette di valutare il danno cromosomico spontaneo o indotto in termini di frequenza di micronuclei. Un aumento della frequenza di cellule contenenti micronuclei può essere un buon *biomarker* di genotossicità prodotta da agenti clastogeni (che danneggiano direttamente il DNA inducendo rotture cromosomiche) o da agenti aneuploidogeni (che, invece, alterano il numero cromosomico, per esempio andando a danneggiare le fibre del fuso, e, quindi, non agiscono direttamente sul DNA).

Il test del micronucleo, comunque, non permette la discriminazione tra micronuclei, che hanno avuto un'origine clastogena, da quelli di origine aneuploidogena (Heddle *et al.*, 1991). Per questo è spesso affiancato dalla tecnica di ibridazione *in situ* fluorescente o **FISH** (Bauman *et al.*, 1980; Migliore *et al.*, 1999), che, grazie all'uso di sonde di DNA specifiche per le sequenze centromeriche dei cromosomi e marcate con fluorocromi, permette l'identificazione della presenza di centromeri nei micronuclei e, quindi, di determinarne il meccanismo di formazione.



**Figura 6.** Cellula branchiale di *M. galloprovincialis* senza micronuclei (A); cellula branchiale di *M. galloprovincialis* con un micronucleo (B, freccia).

## APOPTOSI

La maggior parte delle cellule ha la capacità di auto-distruggersi mediante l'attivazione di un programma di suicidio al quale sembrano fare eccezione solo cellule particolarmente specializzate quali quelle del muscolo cardiaco e del tessuto nervoso. Questo programma suicida prende il nome di **apoptosi** o **morte cellulare programmata**. I primi a descrivere questo tipo di morte cellulare furono Kerr ed altri nel 1972.

Come antagonista della proliferazione cellulare, l'apoptosi contribuisce a mantenere l'omeostasi tra la produzione di nuove cellule e l'eliminazione delle cellule prodotte in numero eccessivo, che sono sfuggite ai meccanismi di controllo del processo di sviluppo cellulare o di cellule che hanno subito un danno genetico. In assenza di cambiamenti compensatori nella proliferazione cellulare, alterazioni del tasso di mortalità cellulare possono tradursi in un accumulo o in una perdita di cellule. In base all'alterazione del tasso di scomparsa delle cellule si possono distinguere due possibili tipi di patologia: la prima è associata ad un aumento della sopravvivenza cellulare, mentre nella seconda si osserva un eccesso di morte cellulare. Inoltre, è comunemente accettato che l'eliminazione di alcune cellule sia un prerequisito essenziale per il differenziamento cellulare, ad esempio, nel corso dello sviluppo embrionale. Una deregolazione dell'apoptosi, quindi può portare allo sviluppo di varie patologie, come tumori (Wyllie *et al.*, 1987; Wright *et al.*, 1994), nel caso in cui l'apoptosi venga soppressa (per esempio in cellule con mutazione del gene p53) o malattie autoimmuni (Cohen e Duke, 1992; Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992), nel caso di una sovraespressione.

A differenza della cellula necrotica, quella apoptotica perde rapidamente volume condensandosi, si stacca dalle cellule vicine perdendo le specializzazioni di membrana ed esponendo componenti, normalmente nascosti o poco espressi, della membrana plasmatica, come la fosfatidilserina. Questi vengono riconosciuti dalle cellule vicine, che operano la fagocitosi della cellula morente. L'organizzazione interna è mantenuta, almeno nelle fasi precoci del processo, mentre a livello nucleare si osserva la disgregazione del/i nucleolo/i, il taglio della lamina, la condensazione e il taglio della cromatina in frammenti di 180-200 paia di basi o multipli interi di questi numeri. Granuli compatti di cromatina degradata si spostano verso la periferia del nucleo, formando spesso una caratteristica figura a mezzaluna. Frammenti discreti di materiale nucleare raggiungono in seguito la membrana plasmatica, dove vengono circondati da evaginazioni della membrana stessa (*blebbing*), che conferiscono alla cellula un aspetto a bolle. Queste "bolle" si staccano dal corpo cellulare trascinando con sé parte del citoplasma e del materiale nucleare e dando origine ai cosiddetti corpi apoptotici che vengono fagocitati dalle cellule vicine. Poiché non si ha versamento di contenuto citosolico nell'ambiente, non ha origine alcun processo flogistico secondario.

Tutto il processo non dura che una due ore e colpisce solamente alcune cellule all'interno di un tessuto, rendendone così difficoltosa l'identificazione (Golstein *et al.*, 1991; Majno e Joris, 1995).

Il verificarsi di fenomeni di morte cellulare programmata, anche al di fuori di fasi dello sviluppo o dell'omeostasi tissutale, ha indotto ad attribuire un ruolo fondamentale nel processo non solo ad un "orologio" intracellulare, quanto piuttosto alla presenza o all'assenza di ben precisi stimoli fisici o chimici o di molecole segnale. Queste molecole, di origine esogena od endogena, innescano percorsi biochimici diversi per giungere ad attivare la fase centrale di



esecuzione del programma di morte. Questa fase centrale, su cui sembrano convergere tutte le altre, è stereotipata ed irreversibile e porta ai cambiamenti morfologici e biochimici tipici dell'apoptosi. Fra i percorsi biochimici coinvolti alcuni sono ubiquitari (ad esempio, quello innescato dalla proteina p53), altri invece sono presenti solo in alcuni specifici tipi cellulari e si attivano esclusivamente in determinati momenti (ad esempio, quello innescato dalla proteina Fas).

La fase di esecuzione sembra essere comune a tutte, o quasi, le vie d'innescamento ed è costituita da una serie di reazioni enzimatiche a cascata, in un certo modo, paragonabili a quelle del complemento o della coagulazione del sangue. Una volta innescata, la reazione non è più arrestabile e procede automaticamente portando a morte la cellula. Gli enzimi coinvolti sono detti **caspasi** (*cysteinyl aspartate specific proteinase*) (Alnemri *et al.*, 1996) e sono proteasi caratterizzate da un'assoluta specificità per i residui di aspartato nella posizione P<sub>1</sub> del sito catalitico. Le caspasi sono presenti in forma inattiva nel citoplasma; ognuna di esse è attivata dalla precedente e, a sua volta, attiva la seguente, fino ad arrivare al taglio dei substrati finali. Questi includono proteine coinvolte nella riparazione e duplicazione del DNA, nello *splicing* del RNA, nel mantenimento della struttura citoscheletrica, nella divisione cellulare, nella frammentazione del DNA, ecc. Il riconoscimento e la fagocitosi dei corpi apoptotici, risultanti dalla degradazione della cellula, completano il processo di morte cellulare programmata. Queste fasi, tuttavia, sono ancora poco conosciute rispetto a quelle di innescamento ed esecuzione. Nei tessuti, i corpi apoptotici sono rapidamente fagocitati dalle cellule circostanti e/o dai macrofagi e degradati all'interno dei lisosomi (Savill *et al.*, 1993). Qualunque sia la modalità con cui le cellule ed i corpi apoptotici vengono riconosciuti e fagocitati, il risultato finale è sempre quello di un'eliminazione pulita, senza sconvolgimento dell'architettura strutturale del tessuto e senza innescamento di un processo flogistico.

Fenomeni apoptotici possono essere attivati anche dall'azione di alcuni contaminanti ambientali come gli IPA, i PCB, e i metalli pesanti. Infatti molti contaminanti sono genotossici ed il danneggiamento del DNA, superate le capacità di riparazione delle cellule, attiva il meccanismo apoptotico; lo stesso vale per l'aumentato livello cellulare di specie reattive dell'ossigeno (Ahemed *et al.*, 2000). Inoltre, alcune sostanze possono influenzare direttamente l'insorgere di fenomeni apoptotici. Per esempio, l'S-(1,2-diclorovinil)-L-cisteina, la cisteina coniugata del contaminante ambientale tricloroetilene, è in grado di causare apoptosi in cellule del tubulo prossimale nell'uomo (hPT) a dosi comparabili con quelle ambientali e a concentrazioni e tempo di incubazione inferiori a quelli necessari per indurre necrosi (Lash *et al.*, 2001).

E' stato dimostrato che l'esposizione agli IPA induce apoptosi negli oociti di topo, con un meccanismo dipendente dall'attivazione del recettore Ah, mentre la diossina, un altro induttore del recettore Ah, non produce gli stessi effetti (Matikainen *et al.*, 2001). Infatti, il trattamento con

diossina (tetraclorodibenzo-p-diossina, TCDD) sembra essere capace di sopprimere gli effetti dei raggi UV e del 2-acetilaminofluorene, che, in precedenza, avevano provocato un aumento dei fenomeni apoptotici e della frammentazione del DNA negli epatociti di ratto (Worner e Schrenk, 1996). L'inibizione dell'apoptosi da parte della TCDD, permettendo la sopravvivenza di epatociti che portano danno genetico, potrebbe, quindi, essere cruciale per la sua azione di promotore tumorale nel fegato.

Esistono diverse metodiche per valutare la presenza di cellule apoptotiche che vanno da quelle immunologiche come il test dell'**Annessina V** (Vermes *et al.*, 1995; van Engeland *et al.*, 1998), che usa come parametro specifico di apoptosi, la redistribuzione della fosfatidilserina sul lato esterno della membrana plasmatica, a quelle che sfruttano la frammentazione del materiale genetico caratteristica di questo processo come il **TUNEL Assay** (*TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling*) (Gavrieli *et al.*, 1992), che utilizza la deossinucleotidil Transferasi Terminale (TdT) per incorporare nucleotidi modificati (fluoresceina-12-dUTP) all'estremità 3'-OH libera dei frammenti di DNA nelle cellule apoptotiche. Le cellule, con la frammentazione del DNA tipica del processo apoptotico (180-200 pb o multipli di questi numeri), possono essere visualizzate con un microscopio a fluorescenza e quantificate con la citometria a flusso. Il TUNEL Assay misura la frammentazione del DNA nucleare nelle cellule apoptotiche a livello di singola cellula o in sospensioni cellulari. Il **Diffusion Assay** (Vasquez e Tice, 1997, Singh 2000) è un'altra metodica, relativamente recente, che permette di mettere in evidenza la presenza di cellule apoptotiche sulla base della frammentazione del DNA di ogni singola cellula.

#### Comet assay ed Apoptosi

Nell'interpretazione degli SB, un ulteriore punto da tener in considerazione è la possibilità che essi siano il risultato della digestione cellulare durante il processo di morte cellulare (apoptosi e necrosi). Nel corso degli studi sul danneggiamento del DNA, è stato dimostrato che il *Comet Assay* è capace di rilevarne il danneggiamento citotossico a seguito dei processi di apoptosi e necrosi (Olive *et al.*, 1993; Vasquez e Tice, 1997).

Infatti, l'apoptosi, o morte cellulare programmata, porta alla formazione di SB a livello di doppio filamento (DSB) (Carson *et al.*, 1986; Marks e Fox, 1991); in modo simile, il DNA della cellula necrotica può andare incontro a degradazione dovuta all'induzione di DBS (Williams *et al.*, 1974; Elia *et al.*, 1994). La frammentazione del DNA che si verifica durante questi processi può essere confusa con l'effetto della genotossicità di qualche xenobiotico e, quindi, portare confusione nell'interpretazione del dato (falsi positivi).

Purtroppo non ci sono molti lavori che comparino i risultati del *Comet Assay* con quelli di specifici test per rilevare l'apoptosi. Roser *et al.* (2001) lo hanno fatto con il test dell'annexina V in cellule HT-29 esposte a due sostanze genotossiche (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e la MNNG) e alla staurosporina, un induttore dell'apoptosi. Questi autori hanno dimostrato la capacità di agenti diversi di

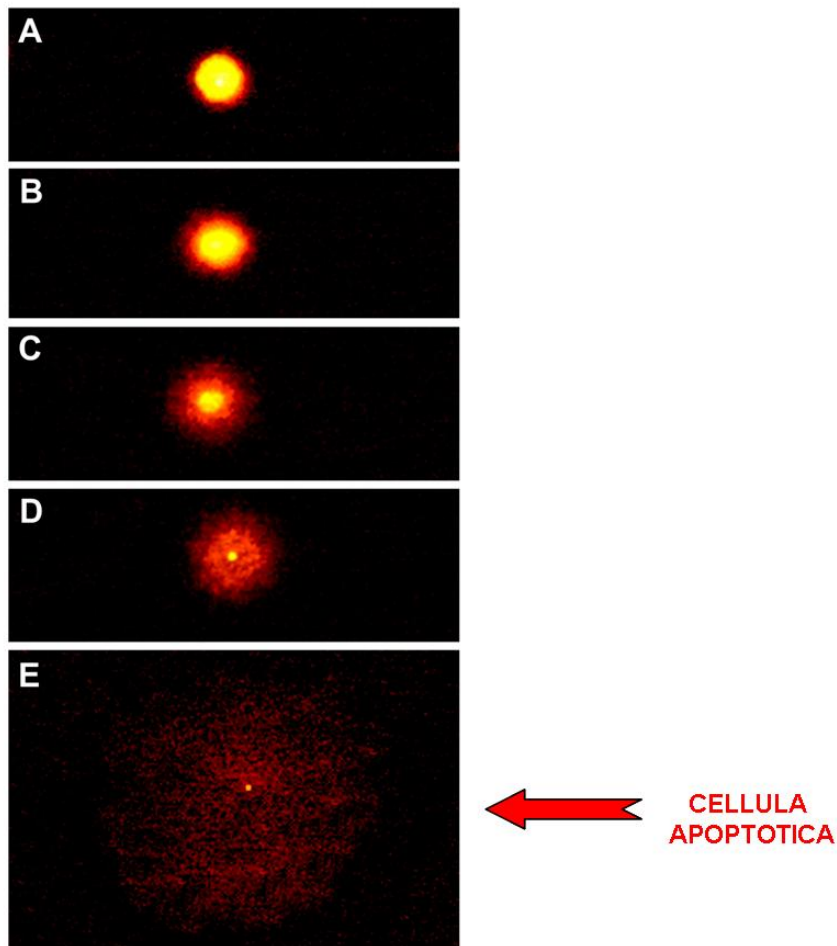
produrre apoptosi e danno al DNA nella stessa popolazione di cellule e che, queste capacità, dipendono dalla dose e dal composto considerato e gli effetti sono indipendenti gli uni dagli altri ed anche dalla citotossicità generale.

Choucroun ed altri (2001) invece hanno valutato le potenzialità del *Comet Assay*, nel rilevare apoptosi precoci, in cellule trattate con anticorpi monoclonali anti-Fas, in assenza di ogni genotossicità, ed hanno comparato i risultati della SCGE con quelli ottenuti dalla colorazione con Yopro-1, un indicatore precoce di apoptosi. Questi autori concludono che l'inizio del processo apoptotico possa dare comete con aspetto e parametri della coda simili a quelle di cellule con un moderato danno al DNA. Perciò, potrebbe essere utile affiancare al *Comet Assay*, indagini in grado di quantificare il contributo dell'apoptosi al dato osservato dalla lettura delle comete, in modo da ottenere una migliore comprensione delle risposte cellulari alla contaminazione chimica.

In risposta a questo problema, Vasquez e Tice (1997) hanno sviluppato, un test di diffusione del DNA nel gel di agarosio, non sottoposto ad elettroforesi, per rilevare le cellule apoptotiche (***Diffusion Assay***). Infatti, a causa del basso peso molecolare (PM) del DNA nelle cellule apoptotiche terminali, il DNA della maggior parte di queste cellule può essere perso dal gel in condizioni elettroforetiche tipiche (Vasquez e Tice, 1997). Nel *Diffusion Assay*, i vetrini vengono tolti dalla soluzione di lisi entro un'ora dalla loro immersione, lavati con un tampone neutro, colorati con bromuro di etidio ed osservati al microscopio a fluorescenza. Le cellule apoptotiche vengono distinte in base al caratteristico *pattern* di colorazione del DNA, estremamente diffuso (figura 7). Infatti, in condizioni neutre, non usando elettroforesi, un'estensiva diffusione del DNA si può verificare solo se questo ha un peso molecolare molto basso, ottenuto attraverso un'ampia degradazione a seguito di DBS.

Le due linee cellulari (sup<sup>+5</sup> e sup<sup>-3</sup>), su cui è stata messa a punto questa metodica, permettono la discriminazione tra cellule in apoptosi e cellule necrotiche (Preston *et al.*, 1994). Infatti, queste linee cellulari preneoplastiche, derivate da cellule embrionali di *Syrian hamster*, vanno incontro rispettivamente a fenomeni apoptotici (sup<sup>+5</sup>) o necrotici (sup<sup>-3</sup>) in presenza di basse concentrazioni di siero.

Il *Diffusion Assay*, che è stato poi perfezionato da Singh (Singh, 2000), come il *Comet*, è applicabile ad ogni cellula eucariotica nucleata, sia per esperimenti *in vivo* che in coltura ed è un metodo quantitativo che mette in evidenza la frammentazione del DNA nucleare a livello di singola cellula. In più è rapido, richiede un numero relativamente basso di cellule, e, utilizzando gli stessi preparati, è un utile complemento al *Comet Assay*.



**Figura 7.** *Diffusion assay.* pattern di diffusione del DNA nel gel, di una cellula non danneggiata (A); di cellule con vari gradi di danno al DNA ma non apoptotiche (B, C e D) e di una cellula apoptotica (E).

## DISTRUTTORI ENDOCRINI

I distruttori endocrini (DE) rappresentano un gruppo di contaminanti dell'ambiente e degli alimenti in grado di interferire con l'omeostasi endocrina, soprattutto degli ormoni sessuali e degli ormoni tiroidei, causando effetti avversi sulla salute di un organismo, oppure della sua progenie, o di una (sotto) popolazione" (*European Workshop on the Impact of Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife* 1996).

La fase più sensibile all'azione dei DE è sicuramente quella riproduttiva, che può essere considerata come un *continuum* che va dalla produzione di gameti alla fertilizzazione fino allo sviluppo della progenie. Particolare attenzione va riservata alla valutazione dei rischi per l'infanzia, dato il ruolo fondamentale svolto dal sistema endocrino nelle prime fasi della vita.

Tuttavia, possono costituire potenziali bersagli dei DE tutti quei tessuti/organi in cui siano presenti recettori specifici per gli ormoni steroidi e tiroidei, tra cui il tessuto scheletrico, il sistema cardiovascolare, il sistema nervoso centrale (SNC); esiste inoltre un'ampia gamma di effetti che prescindono dalla semplice competizione per il legame al recettore. Pertanto, è verosimile che i

rischi sanitari associati all'esposizione ai DE non si esauriscano con interferenze sulla funzione riproduttiva. (Meranghi e Mantovani 2003).

I principali DE sono costituiti da contaminanti organici persistenti, diversi pesticidi e biocidi, sostanze di uso industriale (ftalati e ritardanti di fiamma polibromurati) e recentemente suscitano attenzione gli effetti endocrini di alcuni metalli (per esempio i composti dell'arsenico) (<http://www.iss.it/sitp/dist/index.html>). Possono considerarsi DE anche sostanze diverse dai tipici contaminanti ambientali e/o alimentari, come i fitoestrogeni, sostanze di origine vegetale.

Alcuni metalli pesanti come il mercurio, il piombo ed il cadmio sono in grado di danneggiare direttamente gli organi riproduttivi provocandone degenerazione, necrosi, infiammazione edema ecc. (Colborn et al., 1993; ATSDR, 1998 a, b, c).

Anche l'antimonio, il bario ed il cromo sembrano comportarsi come distruttori endocrini (Suck-Yuong et al., 2003).

I meccanismi d'azione dei DE comprendono interazioni recettoriali, interazioni con enzimi e con il trasporto degli ormoni, influenze sull'asse ipotalamo-ipofisario. Tuttavia, queste distinzioni non vanno prese in maniera eccessivamente rigida: il tipo di effetti indotti da alcuni DE può infatti variare con il sesso e l'età dell'organismo esposto.

È quindi evidente una molteplicità di usi con una conseguente, potenziale esposizione multipla nell'ambiente, negli alimenti, in ambiente lavorativo e/o domestico, e inoltre, una varietà di meccanismi con bersagli ed effetti molteplici.

Molti di questi composti finiscono inevitabilmente per ritrovarsi nell'ambiente acquatico soprattutto fluviale e costiero, con rischi evidenti per la salute riproduttiva degli animali sia invertebrati che vertebrati. Inoltre gli scarichi domestici di grossi centri abitati aggiungono un non trascurabile quantitativo di estrogeni, incluso il 17-  $\beta$ - estradiolo (E2) ed il 17-  $\alpha$ - etilnestradiolo, grazie anche all'aumento utilizzo di estrogeni sintetici, ad esempio, come contraccettivi.

Il test standard per valutare l'attività estrogenica nei vertebrati ovipari è la misurazione della vitellogenina (VTG).

La vitellogenina è una fosfolipoglicoproteina serica ad elevato peso molecolare che rappresenta il maggiore precursore delle proteine del sacco vitellino nei vertebrati ovipari. Questa proteina è sintetizzata e secreta dal fegato in risposta agli estrogeni circolanti (soprattutto E2) nelle femmine in corso di maturazione sessuale e non è normalmente misurabile nel plasma dei maschi e delle femmine immature. Per questo motivo la presenza di vitellogenina nel plasma di un animale è considerata un *biomarker* altamente specifico di esposizione ad estrogeni endogeni o ambientali o ancora a sostanze che mimano il comportamento degli estrogeni nei vertebrati ovipari, compresi pesci, anfibi e rettili.

Le proprietà immunologiche e strutturali della VTG possono variare enormemente da una specie all'altra, anche tra quelle più ravvicinate, e ciò limita un'applicazione su vasta scala di questo saggio.

L'analisi dell'espressione dell'mRNA della vitellogenina nel fegato di pesci sembra essere un approccio promettente per il monitoraggio dell'esposizione ad DE ad effetto estrogenico in ambiente acquatico (Bowman *et al.*, 2000; Barucca *et al.*, 2005). In particolare, i livelli di mRNA aumentano rapidamente con l'induzione del gene per la VTG, rivelando con un'elevata sensibilità l'esposizione recente a molecole con azione estrogenica.

# Scopo della tesi

Questa ricerca si propone lo studio di alcune risposte cellulari a situazioni di possibile rischio per lo stato di salute di individui e popolazioni, in relazione all'esposizione cronica all'inquinamento chimico, soprattutto da metalli pesanti, ed alcuni casi di esposizioni acute sia a contaminanti di origine chimica ed antropica (idrocarburi policiclici aromatici, IPA) sia a tossine di origine naturale (biotossine algali).

Per questo studio è stato scelto l'ambiente acquatico sia marino che fluviale, notoriamente sottoposto ad un forte impatto legato ad una molteplicità di attività umane, tra le quali le produzioni industriali, l'agricoltura, l'urbanizzazione ed il turismo.

Sono stati presi in considerazione un modello animale vertebrato e relativamente mobile (pesci) ed un modello invertebrato e sessile (molluschi bivalvi). In generale, le risposte cellulari utilizzate come *biomarker* di stress in questo studio, sono state la valutazione dell'integrità del DNA, attraverso il *Comet assay*, la quantificazioni di danno cromosomico, in termini di percentuale di cellule micronucleate, lo stato di salute del comparto lisosomale e l'induzione di fenomeni apoptotici.

# Materiali e metodi

## CAMPIONAMENTI

### 1 Esposizione acuta

#### a) Esposizione ad idrocarburi a seguito di una perdita di petrolio nel porto di Göteborg

L'estuario del fiume Göta, che attraversa gran parte della Svezia occidentale, ospita il porto più grande della Scandinavia ed il più grande terminale petrolifero della Svezia. I sedimenti nell'estuario sono contaminati da composti come policlorobifenili (PCB), idrocarburi policiclici aromatici (IPA), furani, diossine e metalli pesanti.

L'esposizione acuta ad una miscela di idrocarburi policiclici aromatici è stata studiata in seguito ad un incidente avvenuto nel porto di Göteborg (Svezia), alla fine del giugno del 2003: in questa occasione si sono accidentalmente riversate nel porto dalle 10 alle 100 tonnellate di petrolio, contenenti il 24,7% di IPA. Il petrolio si è disperso in acqua e ne è stata recuperata soltanto una minima quantità. Questo ha comportato sicuramente un rapido aumento dello stress ambientale a cui sono stati sottoposti gli animali che vivono nel porto.

I pesci della specie *Zoarces viviparus*, sono stati tenuti in gabbia nelle stazioni oggetto di indagine per 2/3 giorni prima di essere processati per le analisi. Le stazioni selezionate sono state Skalkorgarna (sito 2), nel porto di Göteborg, la zona che maggiormente risente dell'impatto dell'attività portuale, Aspholmarna (sito 3), la zona più interessata dallo sversamento e Nordre älv (sito 1) scelto come sito di controllo (Figura 8).

I campionamenti sono stati effettuati nel luglio 2003, dopo la fuoriuscita di petrolio, e nel novembre dello stesso anno. I campioni di sangue sono stati prelevati dalla vena caudale degli animali con una siringa eparinizzata, trasferiti in eppendorf, conservati in ghiaccio, spediti in Italia e processati entro le 24 ore. Dopo il prelievo di sangue i pesci sono stati sacrificati, pesati e misurati.

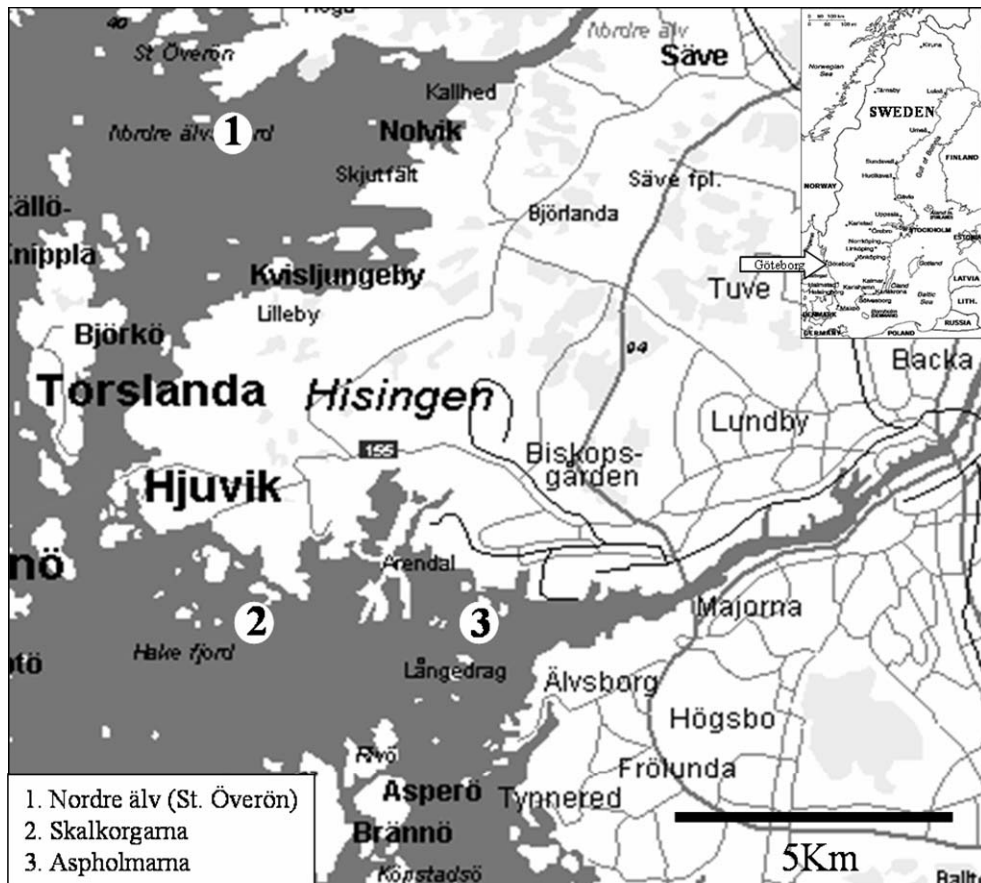
Quindi, a seguito di dissezione, è stata prelevata la bile con una siringa, conservata a  $-80^{\circ}\text{C}$  e processata in seguito dai colleghi del Dipartimento di Zoologia/Zoofisiologia dell'Università di Göteborg (Svezia).

Gli animali avevano un peso medio di  $55.2 \pm 21.6$  g e una lunghezza media di  $22.8 \pm 2.3$  cm.

Per le analisi sono stati utilizzati 12 pesci per sito.



Gli eritrociti sono stati processati per la valutazione dell'integrità del DNA (attraverso il *Comet assay*) e dell'incidenza di cellule apoptotiche (attraverso il *Diffusion assay*) (Frenzilli *et al.* 1999 e Singh 2000). I livelli dei metaboliti degli IPA nella bile (Aas *et al.*, 2000) sono stati valutati dai colleghi del Dipartimento di Zoologia/Zoofisiologia dell'Università di Göteborg (Svezia).



**Figura 8.** La mappa mostra i siti di campionamento nell'area del porto di Göteborg. 1, Nordre älv, (sito di controllo); 2, Skalkorgarna (nel porto di Göteborg); 3, Aspholmarna (la zona più interessata dalla perdita di petrolio).

## b) Effetti dell'esposizione a tossine algali

Negli ultimi anni l'alga rossa della specie *Polysiphonia fucoides*, è diventata particolarmente abbondante lungo le coste orientali della Svezia.

La morte di queste alghe provoca l'accumulo all'interno di pozze costiere di materiale organico, che si è rivelato tossico per gli animali (uccelli, cani e bovini) che sono accidentalmente entrati in contatto con l'acqua contenuta nelle pozze e ha creato notevoli problemi alla pesca locale al turismo.

Estratti di quest' alga sono perciò stati utilizzati per un esperimento di esposizione *in vivo*.

Come specie ittica è stata scelta la trota arcobaleno (*Oncorhynchus mykiss*).

Gli estratti algali sono stati ottenuti attraverso la spremitura dell'alga in acqua di mare (circa 400g/l) in modo da mimare il processo naturale attraverso il quale i metaboliti algali sono rilasciati nell'ambiente.

Le trote sono state esposte per 7 giorni ad una concentrazione di estratto algale nell'acqua pari allo 0,5%.

Come controllo positivo per la genotossicità è stato utilizzato l'IPA Benzo-a-pirene (20 mg/Kg), iniettato intrapeitonealmente 7 giorni prima del campionamento.

Per le analisi di genotossicità sono stati utilizzati 5 pesci per trattamento (controllo, trattati con l'estratto algale e controllo positivo).

Gli eritrociti sono stati processati per la valutazione dell'integrità del DNA sia in termini di *single strand breaks* che di *double strand breaks* (attraverso il *Comet assay*) e dell'incidenza di cellule apoptotiche (attraverso il *Diffusion assay*).

Dai campioni di sangue prelevati è stata strisciata una goccia di sangue per ogni campione, su due vetrini da microscopia e processata per il test del micronucleo (Belpaeme *et al.*, 1996).

Inoltre sono stati processati altri 12 animali per il gruppo di controllo e per quello esposto agli estratti algali, per valutare i parametri antiossidanti e l'attività EROD nelle cellule epatiche (Stephensen *et al.*, 2002; Sturve *et al.*, 2005) dai colleghi del Dipartimento di Zoologia/Zoofisiologia dell'Università di Göteborg (Svezia).

## **2 Esposizione cronica**

### **a) Biomonitoraggio delle coste della Toscana**

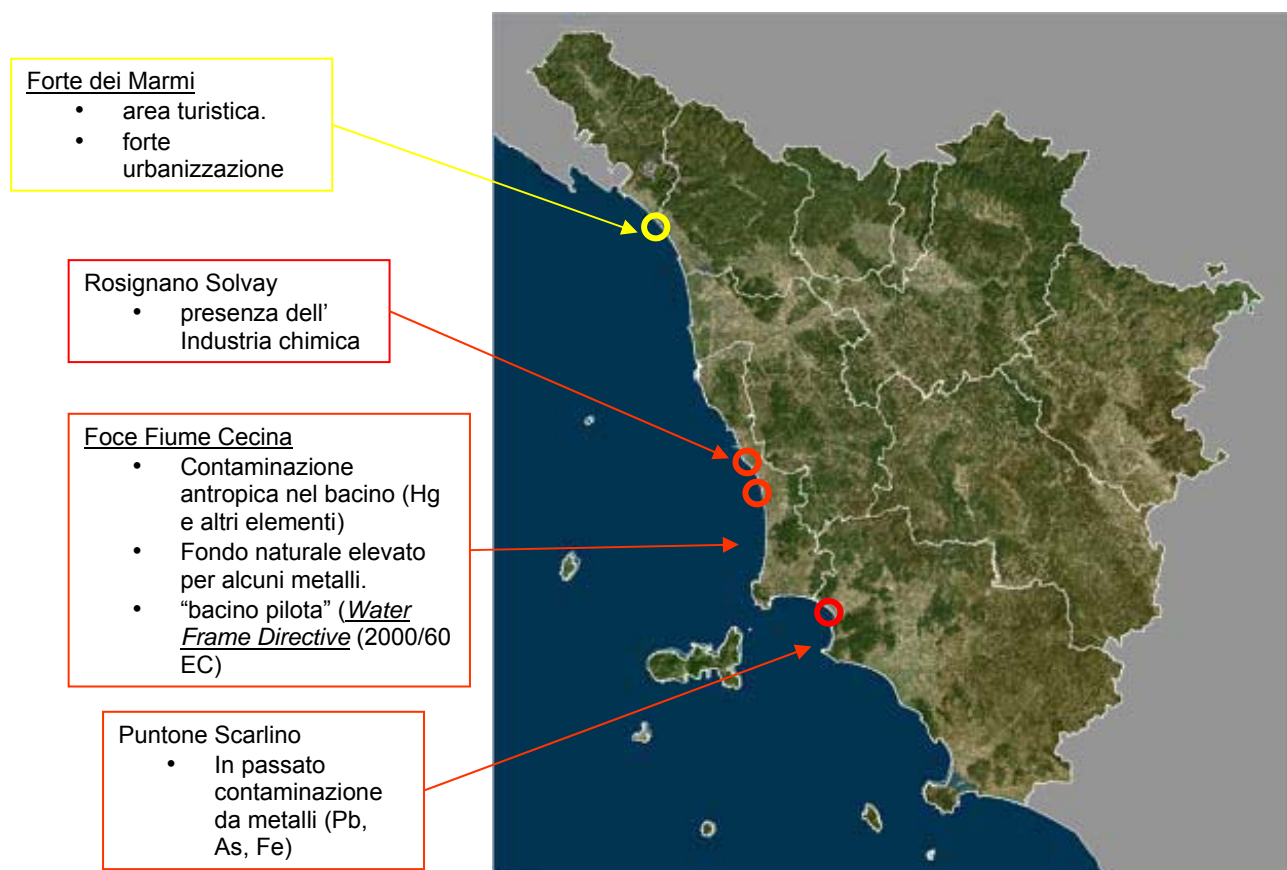
Per esplorare ulteriormente le potenzialità che scaturiscono dall'integrare lo studio del bioaccumulo e dei *biomarker*, è stato avviato un progetto in collaborazione con ARPAT dal titolo: "Proposte per il monitoraggio delle acque marine costiere e per la valutazione della qualità ambientale". Lo studio, centrato su *Mytilus galloprovincialis*, ha previsto l'utilizzo di un'ampia batteria di *biomarker* in alcune stazioni critiche della costa toscana, comprendenti siti influenzati da attività industriali (Puntone Scarlino e Rosignano Solvay), un estuario (la foce del fiume Cecina) e Forte dei Marmi, stazione inserita in area turistica (figura 9).

I mitili sono stati prelevati *in situ* e trasportati in laboratorio avvolti in panni bagnati con acqua di mare in contenitori termici.

Gli effetti genotossici dell'esposizione all'ambiente in esame sono stati valutati a livello molecolare tramite il *Comet assay* e a livello cromosomico tramite il test del micronucleo (Nigro *et al.*, 2006). Gli effetti sulla stabilità dei lisosomi sono stati valutati nell'emolinfa mediante la tecnica rosso neutro e quelli sull'accumulo di lipofuscina sono stati valutati nella ghiandola digestiva (Nigro *et al.*, 2006).

Per ogni stazione sono stati utilizzati 30 animali. I mitili sono stati scelti per quanto possibile di taglia media (lunghezza media della conchiglia  $4.5 \pm 5$  cm).

La quantificazione del bioaccumulo di metalli, la risposta del complesso sistema antiossidante, l'induzione di metallotioneine sono state effettuate sulla ghiandola digestiva (Regoli *et al.*, 2004) dai colleghi dell'Università Politecnica delle Marche, Istituto di Biologia e Genetica.



**Figura 9.** Cartina della Toscana con indicate le stazioni di campionamento: Forte dei Marmi (controllo), Rosignano Solvay, foce del fiume Cecina e Puntone Scarlino.

## **b) Utilizzo di animali trapiantati nel monitoraggio dell'ambiente marino costiero: foce del fiume Cecina**

Il Fiume Cecina scorre attraverso la Toscana Meridionale e risulta pesantemente influenzato da diverse attività antropiche legate all'estrazione di salgemma, alla produzione industriale di cloro-alcali (responsabile di una contaminazione da Hg), allo sfruttamento della geotermia ed all'agricoltura. Inoltre, peculiarità dell'intero bacino fluviale è la presenza di un elevato fondo naturale di alcuni metalli, per la presenza di minerali ofiolitici. Infine il fiume Cecina è stato selezionato come bacino pilota nella *Water Frame Directive* (2000/60 European Community).

Recentemente è stato approvato dalla regione, un programma di bonifica atto a rimuovere le principali fonti di inquinamento e a ripristinare la qualità ambientale del fiume.

Per tutti questi motivi è stato oggetto di ulteriori approfondimenti.

Alcuni mitili della specie *Mytilus galloprovincialis*, provenienti da un allevamento di Lerici (La Spezia), sono stati trapiantati parte in un sito di controllo (Isola di Palmaria, La Spezia) e parte alla foce del fiume Cecina, in quattro punti di campionamento scelti a caso tra i 300 m e i 1000 m dal mare e ad una profondità di 1.5 m.

Dopo quattro settimane, animali di entrambi i siti (controllo e foce del fiume) sono stati campionati, trasportati in laboratorio avvolti in panni umidi in contenitori termici e processati per le analisi.

Inoltre, sono stati campionati alcuni individui appartenenti alla popolazione naturale residente alla foce del fiume Cecina.

Per ogni sito o popolazione di campionamento sono stati processati 30 animali per le analisi rosso neutro, *Comet assay*, test del micronucleo, accumulo di lipofusina, bioaccumulo di metalli (Nigro *et al.*, 2006).

E' stata effettuata anche un'indagine morfometrica dei lisosomi della ghiandola digestiva al microscopio elettronico (Domouhtsidou e Dimitriadis, 2001) su 4 animali per ogni sito/popolazione.

I mitili sono stati scelti per quanto possibile di taglia media (lunghezza media della conchiglia  $4.5 \pm 5$  cm).

Le ghiandole digestive provenienti da 30 individui per ogni punto sperimentale sono state suddivise in 6 pool e congelate a  $-80^{\circ}\text{C}$  per la quantificazione del bioaccumulo di metalli da parte dei colleghi dell'Università Politecnica delle Marche, Istituto di Biologia e Genetica.

### **c) Valutazione ecotossicologica di un ambiente fluviale: fiume Cecina**

Lungo il corso del fiume, sono poi stati scelti tre siti di campionamento, uno di controllo (Masso delle fanciulle) e due noti per la loro contaminazione, soprattutto da mercurio, (Saline di Volterra e Ponteginori). Come organismo bioindicatore è stato scelto il cavedano (*Leuciscus cephalus*). I pesci sono stati pescati e processati sul posto.

I pesci campionati avevano un peso medio di  $73,37 \pm 12.26$  g ed erano lunghi in media  $20,39 \pm 0,85$  cm.

Il danno al DNA è stato valutato in termini di *strand breaks* attraverso il *Comet assay*, mentre il test del micronucleo è stato effettuato sia sul sangue periferico che nel sangue del rene cefalico (Palhares e Koppe Grisolia, 2002). La percentuale di cellule apoptotiche è stata valutata mediante il *Diffusion assay*. Le gonadi sono state prelevate allo scopo di discriminare il sesso dei pesci campionati. La possibile induzione dell'espressione della vitellogenina è stata valutata

nel fegato dei maschi (Barucca *et al.*, 2005) dai colleghi del Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotechnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia.

Il bioaccumulo di mercurio è stato quantificato nel muscolo. Nella bile e nel cervello sono stati valutate rispettivamente l'attività EROD e acetilcolinesterasi. Queste analisi sono state svolte dall'Istituto di Biologia e Genetica dell'Università Politecnica delle Marche.

Il sangue periferico è stato prelevato dalla vena caudale dei pesci catturati con una siringa eparinizzata, trasferito in eppendorf e conservato in ghiaccio per poi essere processato per il *Comet* ed il *Diffusion* ed il test del micronucleo entro le 24 ore.

Dopo il prelievo di sangue gli animali sono stati sacrificati e sezionati per il prelievo degli organi: fegato, gonadi, rene, bile, cervello e muscolo. Fegato, bile, cervello, muscolo e gonadi sono stati trasferiti in azoto liquido e poi a  $-80^{\circ}\text{C}$  prima delle analisi.

Porzioni di rene cefalico sono state prelevate con una piccola spatola e strisciate su due vetrini, che una volta asciutti sono stati disposti in una scatola portavetrini e trasportati in laboratorio per le analisi.

## **ANALISI EFFETTUATE**

### **Pesci:**

#### ***SINGLE CELL GEL ELECTROPHORESIS***

Di ogni campione di sangue prelevato, 10  $\mu\text{l}$  sono stati uniti con 990  $\mu\text{l}$  di PBS (tampone salino fosfato, pH 7.4). Da queste sospensioni sono stati prelevati 50  $\mu\text{l}$  ed uniti a 990  $\mu\text{l}$  di PBS. Le sospensioni cellulari sono state centrifugate a 1000 rpm per 10 minuti e il sedimento risultante è stato unito a 225  $\mu\text{l}$  di LMA (*low melting agarose*) 0.5% dissolto in PBS a  $37^{\circ}\text{C}$ . Questa diluizione ci consente di ottenere vetrini con una concentrazione di cellule ottimale per la lettura. Per ogni campione sono stati allestiti 3 vetrini: 75  $\mu\text{l}$  della soluzione ottenuta dal mescolamento del sedimento cellulare con LMA, sono stati stratificati su un vetrino da microscopia, adagiato su di una piastra metallica fredda e precedentemente ricoperto con uno strato di NMA (*normal melting agarose*) 1%. La deposizione sul vetrino di un coprioggetti ha lo scopo di far distendere lo strato di gel. Quindi il vetrino è stato posto a solidificare al buio per 5 minuti a  $4^{\circ}\text{C}$ . Poi è stato tolto il coprioggetti e sono stati aggiunti 85  $\mu\text{l}$  di LMA. Il vetrino, di nuovo coperto con il coprioggetti è stato lasciato solidificare a  $4^{\circ}\text{C}$  per 5 minuti.

Dopo la solidificazione del terzo strato di gel, è stato delicatamente tolto il vetrino coprioggetti ed i vetrini sono stati immersi nella soluzione di lisi e tenuti in frigorifero, al buio, a  $4^{\circ}\text{C}$ . I vetrini così preparati possono rimanere in lisi per non più di un mese. La funzione della soluzione di

lisi è quella di rompere le membrane cellulari e nucleari, in modo da permettere al DNA di migrare durante l'elettroforesi.

Tutte le operazioni sono state condotte ad una temperatura di 20°C ed in condizione di luce gialla, allo scopo di evitare l'introduzione di danno aggiuntivo al DNA.

#### ***Preparazione della soluzione di lisi***

La soluzione di lisi viene preparata a partire da una soluzione detta di "prelisi" (NaCl 2.5 M, Na<sub>2</sub>EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10) alla quale, poco prima dell'uso, vengono aggiunti dimetilsolfossido (DMSO) 10% e TRITON X 100 1%.

#### ***Diffusion assay***

Dopo un' ora un vetrino per campione è stato tolto dalla soluzione di lisi, lavato con 2 ml di soluzione neutralizzante (Tris-HCl, pH7.5) per 3 volte, quindi immerso in metanolo freddo (-20°) per 3 minuti per un più veloce essiccamento.

Una volta tolti dal metanolo i vetrini sono stati lasciati ad asciugare al buio. Quindi sono stati colorati con 100 µl di bromuro di etidio (2 µg/ml) e coperti con un vetrino coprioggetti. I preparati sono stati analizzati al microscopio a fluorescenza (Jeneval) a 50 ingrandimenti.

La quantificazione delle cellule apoptotiche, riconosciute in base al particolare pattern di diffusione del loro DNA nel vetrino, è stata effettuata su un campione di 100 cellule per vetrino.

Tutte le operazioni sono state svolte ad una temperatura di 20°C ed in condizione di luce gialla.

#### ***Analisi statistica***

Le differenze nella percentuale di cellule apoptotiche tra i punti sperimentali sono state analizzate tramite analisi multifattoriale della varianza (MANOVA).

Sono state considerate statisticamente significative differenze tra le medie con un  $p < 0.05$ .

#### ***Comet assay***

I vetrini preparati sono stati tolti dalla soluzione di lisi e disposti in una camera elettroforetica orizzontale. Quindi sono stati ricoperti con una soluzione tampone alcalina fredda (NaOH 300 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM, il cui pH era stato portato a 12.1, aggiungendo HCl) allo scopo di denaturare la doppia elica del DNA, per 10 minuti. Il pH 12.1 è stato scelto per evitare che rotture dovute alla presenza di siti labili agli alcali interferissero con l'interpretazione del dato. Infatti precedenti studi (Frenzilli et al., 1999) avevano dimostrato una forte influenza del pH sulla migrazione del DNA nei pesci: la migrazione del DNA in *Gobius sp.* a pH 12.1 era significativamente minore rispetto a quella ottenuta a pH 13. A questo proposito è stato suggerito che l'elevato grado di avvolgimento della cromatina degli eritrociti di pesce potrebbe contribuire ad una fragilità del genoma esposto a condizioni estremamente alcaline, anche sulla base della consistente quota di siti labili agli alcali, attribuibile al livello di compattazione della cromatina, osservata in eritrociti di pollo e spermatozoi umani e murini (Singh et al., 1989). Per cui la migrazione del DNA osservata a pH 13 non esprimerebbe unicamente l'entità del danno genetico dovuto alle condizioni ambientali o all'effetto genotossico dei contaminanti, ma anche

un consistente livello basale di migrazione del DNA, probabilmente legato alla costituzione della cromatina tipica degli eritrociti.

Avvenuta la denaturazione del DNA, è stata eseguita la corsa elettroforetica della durata di 10 minuti a 25 V e 300 mA.

Dopo la corsa i vetrini sono stati trattati per tre volte con 2 ml di una soluzione neutralizzante (Tris-HCl, pH 7.5) al fine di ripristinare un pH quasi neutro e consentire la successiva colorazione.

Successivamente i vetrini sono stati immersi nel metanolo freddo (-20°) per tre minuti per un migliore e più veloce essiccamento. I vetrini così preparati, una volta asciutti, possono essere conservati in scatole portavetrini, in ambiente secco.

Al momento dell'osservazione i vetrini sono stati colorati con 100 µl di bromuro di etidio (2 µg/ml) ed analizzati al microscopio a fluorescenza (Jeneval) a 50 ingrandimenti. La migrazione del DNA verso l'anodo, proporzionale al danno genetico, è stata valutata mediante un sistema di analisi dell'immagine collegato al microscopio (Komet 4, Kinetic imaging, Ltd). Il parametro utilizzato per valutare il danno al DNA è la percentuale di DNA migrato nella coda a causa dell'osservazione che la lunghezza della coda ed il *tail moment* sono parametri influenzabili da differenze del gel, che possono diminuire la migrazione del DNA (McKelvey-Martin *et al.*, 1993). Per ogni animale sono stati preparati 2 vetrini, per ogni vetrino sono state lette 50 cellule.

Tutte le operazioni sono state svolte ad una temperatura di 20°C ed in condizione di luce gialla.

### ***Neutral Single Cell Gel Electrophoresis***

I vetrini preparati sono stati tolti dalla soluzione di lisi e lavati con una soluzione 1 x di TBE ottenuta diluendo una soluzione stock di TBE 10x (1M tris, 0.9 M acido borico, 0,01 M EDTA, pH 8).

Quindi i vetrini sono stati disposti in una camera elettroforetica orizzontale, ricoperti con una soluzione tampone (TBE 1x) e fatti correre per 10 minuti a 25 V e 40 mA.

Dopo la corsa i vetrini sono stati trattati per tre volte con 2 ml di una soluzione neutralizzante (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) al fine di ripristinare un pH quasi neutro e consentire la successiva colorazione.

Successivamente i vetrini sono stati immersi nel metanolo freddo (-20°) per tre minuti per un migliore e più veloce essiccamento. I vetrini così preparati, una volta asciutti, possono essere conservati in scatole portavetrini, in ambiente secco.

La colorazione, l'osservazione e l'analisi dei vetrini sono identiche a quelle eseguite per il *Comet assay*.

### ***Analisi statistica***

Le differenze nella percentuale di frammentazione del DNA tra i punti sperimentali nel sangue periferico sono state analizzate tramite analisi multifattoriale della varianza (MANOVA). I fattori

considerati sono stati, sito di campionamento (o nel caso dell'esposizione in vivo, trattamento), replica e nel caso di campionamenti effettuati in giorni diversi, data del campionamento. Sono state considerate statisticamente significative differenze tra le medie con un  $p < 0.05$ .

## **TEST DEL MICRONUCLEO**

### ***Sangue***

Di ogni campione di sangue prelevato, è stata strisciata una goccia su due vetrini da microscopia. I vetrini sono stati lasciati asciugare all'aria e quindi fissati in metanolo freddo ( $-20^{\circ}$ ) per 20 minuti, colorati con Giemsa al 6% per 15 minuti, sciacquati in acqua distillata e lasciati asciugare.

### ***Rene cefalico***

Nei pesci il rene è responsabile dell'eritropoiesi così come della filtrazione. Quando un pesce viene esposto a tossine gli eritrociti difettosi passano dal rene cefalico al sangue periferico dal quale vengono poi rimossi dagli organi preposti. L'ipotesi proposta in questi studi è che l'esame degli eritrociti del rene potrebbe risultare un test più precoce e sensibile rispetto a quella degli eritrociti del sangue periferico nel mettere in evidenza la presenza e la frequenza di micronuclei. Perciò sono state analizzate e confrontate sia la frequenza di micronuclei ottenuta dal sangue periferico che quella ottenuta dal rene cefalico.

Durante il campionamento, porzioni di rene cefalico sono state strisciate su 2 vetrini da microscopia, lasciate asciugare, e riposte in scatole portavetrini.

Una volta in laboratorio, i vetrini sono stati fissati in metanolo freddo per 15 minuti, lasciati asciugare e quindi colorati con il Giemsa al 6% per 15 minuti e sciacquati in acqua distillata.

### ***Osservazione al microscopio***

Una volta asciugati, sia i vetrini del sangue periferico sia quelli del sangue del rene cefalico sono stati siglati, montati con il collante DPX e coperti con un vetrino coprioggetti. Quindi i vetrini sono stati letti con un microscopio ottico con obiettivo ad immersione (100 X). Per ogni individuo sono state lette almeno 2000/5000 eritrociti isolati, con margini ben evidenti.

Sono stati conteggiati soltanto i micronuclei che rispettavano i seguenti parametri:

- Diametro minore di 1/3 del nucleo principale
- Assenza di rifrangenza
- Colorazione uguale o più chiara rispetto alla cromatina del nucleo principale
- Localizzazione in prossimità del nucleo principale, ma non in contatto con esso.

Per ogni individuo la frequenza di micronuclei è stata espressa come numero di cellule micronucleate per 1000 cellule lette.

### ***Analisi statistica***

Le differenze nella percentuale di cellule micronucleate tra i punti sperimentali sia nel sangue periferico che nel sangue del rene cefalico sono state analizzate tramite analisi multifattoriale



della varianza (MANOVA). I fattori considerati sono stati sito di campionamento (o nel caso dell'esposizione in vivo, trattamento) replica, lettore e nel caso di campionamenti effettuati in giorni diversi, data del campionamento.

Sono state considerate statisticamente significative differenze tra le medie con un  $p < 0.05$ .

## **DETERMINAZIONE DEL SESSO**

Le gonadi dei pesci sono state prelevate, immerse in azoto liquido e quindi conservate a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Sezioni del tessuto gonadico congelato, dallo spessore di 8 - 10  $\mu\text{m}$ , sono state preparate con il criostato e deposte su vetrini da microscopia in numero di 3 per vetrino. Per ogni animale sono stati così preparati 2 vetrini, che possono essere conservati in frigorifero  $-80^{\circ}\text{C}$  per un tempo indefinito oppure colorati immediatamente.

Se conservati nel  $-80^{\circ}\text{C}$ , prima di procedere alla colorazione i vetrini devono essere posti per 15/20 minuti nel  $-20^{\circ}\text{C}$  e poi per alcuni minuti nel  $+4^{\circ}\text{C}$ .

### **Colorazione emallume di Carazzi - eosina**

I vetrini sono stati fissati in fissativo di Baker o calcio formolo (3M formaldeide, 60mM acetato di calcio, 5 mM cloruro di sodio) per 15 minuti a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Quindi sono stati sciacquati in acqua distillata e colorati con Emallume di Carazzi (Bancroft e Stevens 1982) per 10 – 15 minuti.

Successivamente i vetrini sono stati trasferiti in acqua distillata per 10 minuti e quindi colorati con eosina per 3 – 5 minuti.

I vetrini così colorati sono stati sciacquati in acqua distillata per 1 minuto e quindi in alcool  $95^{\circ}$  per 5 minuti. Dall'alcool  $95^{\circ}$  i vetrini sono stati passati in alcool puro per 5 minuti e, quindi, in xilolo per altri 5 minuti. Infine i vetrini sono stati montati con balsamo del Canada.

I vetrini sono stati osservati al microscopio ottico.

## **VITELLOGENINA**

Queste analisi sono state svolte dal Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia dell'Università di Pisa.

Per estrarre l'RNA totale da circa 30 mg di ogni campione di fegato è stato utilizzato il kit "Nucleospin RNAII".

L'espressione del gene per la vitellogenina è stata valutata attraverso RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*). Gli oligonucleotidi utilizzati come *primer* sono:

Vg1 Oligo senso: 5' – TGT GTG CTG ATG GTG TTC RG – 3'

Vg2 Oligo antisenso: 5' GGC TCA ACA GAG TAG CAT TT – 3'

L'espressione dell' actina è stata utilizzata come controllo espresso costituzionalmente e la banda corrispondente (430 pb circa) è stata ottenuta in tutti i campioni analizzati.

I *primer* utilizzati per l'actina sono stati:

Ac1 Oligo senso: 5' - CAG GGA GAA GAT GAC CCA GAT - 3'

Ac1 Oligo antisense: 5' – GAT ACC GCA GGA CTC CAT ACC - 3'

Tutti i prodotti dell'amplificazione sono stati fatti correre elettroforeticamente su gel di agarosio al 2%, contenente bromuro d'etidio e le bande di amplificato ottenute sono state analizzate e confrontate agli UV.

## **Mitili:**

### ***SINGLE CELL GEL ELECTROPHORESIS***

Le eppendorf isolate durante il test del micronucleo sono state subito centrifugate per 5 minuti a 1000 rpm, il sedimento risultante è stato unito a 75 µl di LMA (*low melting agarose*) 0.5% dissolto in PBS a 37°C per ogni vetrino che si voleva ottenere.

75 µl della soluzione ottenuta dal mescolamento del sedimento cellulare con LMA, sono stati stratificati su un vetrino da microscopia, adagiato su di una piastra metallica fredda e precedentemente ricoperto con uno strato di NMA (*normal melting agarose*) 1% secondo Klaude *et al.*, 1996. La deposizione sul vetrino di un coprioggetti ha lo scopo di far distendere lo strato di gel. Quindi il vetrino è stato posto a solidificare al buio per 5 minuti a 4°C. Poi è stato tolto il coprioggetti e sono stati aggiunti 85 µl di LMA. Il vetrino, di nuovo coperto con il coprioggetti è stato lasciato solidificare a 4°C per 5 minuti.

Dopo la solidificazione del terzo strato di gel, è stato delicatamente tolto il vetrino coprioggetti ed i vetrini sono stati immersi nella soluzione di lisi e tenuti in frigorifero per almeno un'ora, al buio, a 4°C. I vetrini così preparati possono rimanere in lisi per non più di un mese.

I vetrini preparati sono stati tolti dalla soluzione di lisi e disposti in una camera elettroforetica orizzontale. Quindi, sono stati ricoperti con una soluzione tampone alcalina fredda (NaOH 300 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM, a pH ≥13) allo scopo di denaturare la doppia elica del DNA, per 10 minuti.

Avvenuta la denaturazione del DNA, è stata eseguita la corsa elettroforetica della durata di 5 minuti a 25 V e 300 mA.

Dopo la corsa i vetrini sono stati trattati per tre volte con 2 ml di una soluzione neutralizzante (Tris-HCl, pH 7.5) al fine di ripristinare un pH quasi neutro e consentire la successiva colorazione.

Successivamente i vetrini sono stati immersi nel metanolo freddo (-20°) per tre minuti per un migliore e più veloce essiccamento. I vetrini così preparati, una volta asciutti, possono essere conservati in scatole portavetrini, in ambiente secco.

### **Osservazione al microscopio**

Al momento dell'osservazione i vetrini sono stati colorati con 100 µl di bromuro di etidio (2 µg/ml) ed analizzati al microscopio a fluorescenza (Jeneval) a 50 ingrandimenti. La migrazione del DNA verso l'anodo, proporzionale al danno genetico, è stata valutata mediante un sistema di analisi dell'immagine collegato al microscopio (Komet 4, Kinetic imaging, Ltd). Il parametro utilizzato per valutare il danno al DNA è la percentuale di DNA migrato nella coda. Per ogni animale sono stati preparati 2 vetrini, per ogni vetrino sono state lette 50 cellule.

Tutte le operazioni sono state svolte ad una temperatura di 20°C ed in condizione di luce gialla.

### **Analisi statistica**

Le differenze di frammentazione del DNA tra i punti sperimentali sono state analizzate tramite analisi multifattoriale della varianza (MANOVA). I fattori considerati sono stati, sito o popolazione di campionamento, replica, orario e giorno dell'esperimento.

Sono state considerate statisticamente significative differenze tra le medie con un  $p < 0.05$ .

### **TEST DEL MICRONUCLEO**

I mitili, in numero di 30 per ogni sito di campionamento, dopo il prelievo dell'emolinfa per il rosso neutro, sono stati aperti per permettere l'isolamento di porzioni di branchia.

Ogni porzione è stata sciacquata in 2 ml di Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) al 20 ‰ ottenuta diluendo una soluzione madre al 90 ‰ costituita da: NaCl (80g/l), KCl (4 g/l), Glucosio (10g/l),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (600 mg/l),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (475 mg/l).

Dopo almeno 30 minuti il tessuto è stato recuperato e immerso in 2 ml di soluzione preriscaldata a 37°C, di DISPASI/HBSS al 20 ‰ (1.5 mg/ml). L'enzima dispasi stacca le cellule del tessuto permettendo il recupero di una buona quantità di materiale cellulare.

Dopo 20 minuti a 37°C, l'enzima è stato inattivato mediante diluizione con 4 ml di HBSS al 20 ‰.

Il prodotto della digestione è stato recuperato in piastre Petri, filtrando la soluzione attraverso appositi retini di nylon da 100 µm, che sono stati poi sciacquati con 2 ml di HBSS al 20 ‰ per completare il recupero.

La sospensione cellulare ottenuta è stata trasferita in provette da centrifuga da 10 ml e centrifugata per 5 minuti a 2000 rpm.

Dopo la centrifuga il sopranatante è stato aspirato e 90 µl di *pellet* sono stati trasferiti in una eppendorf per il *Comet assay*.

Il restante precipitato è stato risospeso per almeno 20 minuti in 800 µl di una soluzione di prefissativo composta da 5 % di acido acetico, 3 % di metanolo e 92 % di HBSS al 20 ‰.

Sono seguite altre due centrifughe (5 min. a 2000 rpm). Dopo ognuna delle due centrifughe, il sopranatante è stato aspirato ed il *pellet* fissato in 5 ml di una soluzione di metanolo e acido acetico in rapporto variabile da 5:1 a 3:1 a seconda del grado umidità.

Quindi il tutto è stato di nuovo centrifugato per 5 minuti a 2000 rpm ed il *pellet* ottenuto, risospeso per evitare la formazione di aggregati cellulari è stato gocciato su vetrini da microscopia.

Per ogni animale sono stati allestiti 2 vetrini, che sono stati lasciati ad asciugare all'aria, quindi colorati in una soluzione di Giemsa al 5% per 10 minuti e poi sciacquati in acqua distillata.

#### ***Osservazione al microscopio***

Una volta asciugati, i vetrini sono stati siglati, montati con il collante DPX e coperti con un vetrino coprioggetti. Quindi i vetrini sono stati letti con un microscopio ottico con obiettivo ad immersione (100 X). Per ogni individuo sono state letti almeno 1000 cellule isolate (500 per ogni vetrino), con margini ben evidenti.

Per ogni individuo la frequenza di micronuclei è stata espressa come numero di cellule micronucleate per 1000 cellule lette.

#### ***Analisi statistica***

Le differenze nella percentuale di cellule micronucleate tra i punti sperimentali sono state analizzate tramite analisi multifattoriale della varianza (MANOVA). I fattori considerati sono stati, sito o popolazione di campionamento, replica, orario e giorno dell'esperimento e lettore.

Sono state considerate statisticamente significative differenze tra le medie con un  $p < 0.05$ .

### **ROSSO NEUTRO**

I mitili, in numero di 30 per ogni campionamento, sono stati leggermente aperti senza provocare la rottura del muscolo adduttore. L'emolinfa è stata prelevata tramite l'utilizzo di una siringa ipodermica da 2,5 ml con ago da 25 o 23 G, precedentemente riempita con 0.5 ml di una soluzione salina di acqua di mare sintetica al 33 ‰ di NaCl. L'ago è stato fatto passare tra le valve ed inserito nel muscolo adduttore del mitilo in modo da aspirare 0.5 ml di emolinfa.

Successivamente il contenuto della siringa è stato trasferito in eppendorf siliconate da 2 ml poste in ghiaccio.

Una volta eseguito il prelievo, 50  $\mu$ l della soluzione di emociti ottenuta sono stati depositi su un vetrino da microscopia. I vetrini sono stati posti in una camera umida per 15 minuti a 10°C in modo che le cellule aderissero al vetrino.

Dopo 15 minuti l'eccesso di soluzione cellulare è stato rimosso con una pipetta e i vetrini sono stati colorati con 40  $\mu$ l di una soluzione salina di rosso neutro (10  $\mu$ l di rosso neutro in 5 ml di acqua di mare sintetica). I vetrini sono stati quindi coperti con un vetrino coprioggetto da 22x22 mm e lasciati incubare in camera umida per 15 minuti.

#### ***Osservazione al microscopio***

Trascorsi 15 minuti dalla colorazione i vetrini vengono osservati al microscopio ottico con obiettivo 40 X. La temperatura dei vetrini deve essere mantenuta intorno ai 10°C.

Le cellule si presentano adese al vetrino con diverse espansioni della membrana e con molti granuli (lisosomi) che possono o meno essere colorati dal rosso neutro. Le cellule dove il colorante comunque non è ancora fuoriuscito nel citoplasma, sono state contate come bianche, quelle in cui le membrane lisosomali non riuscivano più a trattenere il colorante, e che quindi apparivano con il citoplasma colorato di rosa o con granuli colorati dai margini sfumati sono state contate come rosse.

Per ogni vetrino sono state effettuate diverse letture ad intervalli di tempo regolari (15, 30, 60, 90, 120 minuti). La lettura è stata interrotta una volta raggiunto il 50% +1 di cellule rosse per il vetrino in esame ed il tempo impiegato per raggiungere questo traguardo è indicato come tempo di ritenzione del rosso neutro espresso in minuti.

### ***Analisi statistica***

Le differenze nella stabilità della membrana dei lisosomi tra i punti sperimentali sono state analizzate tramite analisi multifattoriale della varianza (MANOVA). I fattori considerati sono stati, sito o popolazione di campionamento, replica, orario, giorno dell'esperimento e lettore.

Sono state considerate statisticamente significative differenze tra le medie con un  $p < 0.05$ .

## **LIPOFUSCINA**

Dai mitili aperti per il prelievo delle branchie, è stata prelevata la ghiandola digestiva (epatopancreas) ed immersa in esano freddo (-70°C) e quindi in azoto liquido per poi essere conservata a -80°C.

Sezioni della ghiandola digestiva congelata, dallo spessore di 10 µm, sono state preparate con il criostato e deposte su vetrini da microscopia in numero di 3 per vetrino. Per ogni animale sono stati così preparati 2 vetrini, che possono essere conservati in frigorifero -80°C per un tempo indefinito oppure colorati immediatamente.

Se conservati nel -80°C, prima di procedere alla colorazione i vetrini devono essere posti per 15/20 minuti a -20°C e poi per alcuni minuti nel +4°C.

### ***Colorazione***

I vetrini sono stati fissati in fissativo di Baker o calcio formolo per 15 minuti a 4°C, successivamente sono stati sciacquati in acqua distillata ed immersi per 5 minuti in una soluzione colorante costituita da 75% cloruro ferrico 1%, 10% K-ferricianuro ed 15% acqua distillata. Sono quindi stati effettuati due lavaggi: prima in acido acetico al 2% e poi in acqua distillata.

Infine i vetrini sono stati montati in mezzo acquoso (glicerol gelatina).

### ***Osservazione al microscopio***

Le sezioni migliori sono state fotografate e digitalizzate. Le fotografie sono state analizzate mediante un programma di grafica ed analisi dell'immagine (Scion Image per Windows,

versione 4.0.2) allo scopo di quantificare la presenza di granuli di lipofuscina, evidenti come granuli dal colore verde/azzurro all'interno dei tubuli della ghiandola digestiva.

Per ogni animale sono stati analizzati 20 tubuli digestivi e l'accumulo di lipofuscina è stato espresso in termini di intensità di lipofuscina/  $\mu\text{m}^2$  di tessuto.

#### ***Analisi statistica***

Le differenze nell'accumulo di lipofuscina tra i punti sperimentali sono state analizzate tramite analisi multifattoriale della varianza (MANOVA). I fattori considerati sono stati, sito o popolazione di campionamento e replica.

Sono state considerate statisticamente significative differenze tra le medie con un  $p < 0.05$ .

### **ANALISI MORFOMETRICA DEI LISOSOMI**

Campioni di epatopancreas (ghiandola digestiva) di *M. galloprovincialis* sono stati processati per la microscopia elettronica secondo Domouhtsidou e Dimitriadis (2001). In breve i campioni sono stati fissati in glutaraldeide al 3% in tampone cacodilato 0.1 M con l'aggiunta di saccarosio all'8%, post fissati in tetrossido di osmio 1% nello stesso tampone, disidratati in concentrazioni crescenti di etanolo e infine inclusi in Epon-Araldite. Inoltre è stato effettuato il test citochimico per rivelare la forma attiva della fosfatasi acida secondo la procedura di Lewis e Knight (1977), allo scopo di meglio discriminare i lisosomi secondari o eterolisosomi.

Per l'analisi morfometrica sono stati scelti casualmente 4 blocchi di resina (inclusioni) per ogni sito di campionamento e, per ciascuno, sono state effettuate sezioni ultrasottili mediante l'ultramicrotomo Reichert-Yung Ultracut E. Le sezioni ultrasottili sono state contrastate con acetato di uranile e citrato di piombo e osservate al microscopio elettronico Jeol 100 SX. Per ogni campione sono state esaminate diverse micrografie elettroniche (10000 X) e per ogni individuo sono stati analizzati 200 lisosomi di cui è stato calcolato il diametro medio.

#### ***Analisi statistica***

Le differenze nel diametro medio dei lisosomi tra i punti sperimentali sono state analizzate tramite analisi multifattoriale della varianza (MANOVA). I fattori considerati sono stati, sito o popolazione di campionamento e replica.

Sono state considerate statisticamente significative differenze tra le medie con un  $p < 0.05$ .

# Risultati e Discussione

## 1 Esposizione acuta

### a) Esposizione ad idrocarburi a seguito di una perdita di petrolio nel porto di Göteborg

I risultati di questo studio sono stati pubblicati nei seguenti articoli: G. Frenzilli *et al.* / *Mutation Research* 552 (2004) 187–195 e Del Barga *et al.* / *Biologia Marina Mediterranea* 13 (2) (2006) 48 - 49.

La MANOVA ha rilevato un effetto sia del sito che del tempo di campionamento sull'integrità del DNA.

Un livello più alto di danno genetico (fig. 1), valutato in termini di % di DNA migrato, è stato riscontrato negli eritrociti dei pesci campionati nei siti di Skalkorgarna (sito 2) e Aspholmarna (sito 3) in luglio se comparati con quello misurato nel sito di riferimento di Nordre älv (sito 1).

Gli eritrociti degli animali campionati in novembre nel sito 1 e 2 mostravano la stessa percentuale di integrità del DNA riscontrata a luglio. I pesci del sito 3 che a luglio erano caratterizzati dalla più alta percentuale di danno, a novembre mostravano un livello di danno più basso ( $p < 0.01$ ).

Il *Diffusion assay* (fig. 2) ha rilevato una generale riduzione del numero di cellule apoptotiche nei pesci campionati a novembre in tutti i siti, specialmente nel sito 3 (livelli di cellule apoptotiche 6 - 7 volte più bassi di quelli misurati a luglio,  $p = 0,01$ ).

L'analisi degli IPA nella bile ha dimostrato che i pesci dell'area portuale (siti 2 e 3) erano più esposti agli IPA di quelli dell'area di controllo. Inoltre a luglio è stato notato un drastico aumento della concentrazione dei metaboliti degli IPA nel sito 3 ( $23,82 \mu\text{g kg}^{-1}$  peso fresco  $\pm 33,06$ ), concentrazione che poi si è ridotta cinque mesi più tardi ( $3,02 \pm 1,85$ ).

E' interessante notare come i livelli di danno al DNA registrati a luglio nel sito 3, tre settimane dopo la perdita di petrolio, siano comparabili con quelli ottenuti, durante il mio internato di tesi di laurea su anguille europee (*Anguilla anguilla*) esposte in vivo ad una concentrazione di Benzo-a-pirene di 1 mg/kg (% DNA migrato =  $40.4 \pm 15.6$ ) (Nigro *et al.*, 2002). La genotossicità degli idrocarburi policiclici aromatici è stata dimostrata, inoltre, da molti altri studi che hanno utilizzato il *Comet assay* come *biomarker* (Mitchelmore *et al.*, 1998 e Regoli *et al.*, 2003).

Gli IPA, infatti, vengono metabolizzati dalla citocromo P450 monoossigenasi 1A (Stegeman e Lech 1991, Goksøyr e Förlin 1992). Il metabolismo degli IPA può portare sia alla completa

detossicazione del composto originario sia alla formazione di metaboliti intermedi in grado di formare addotti al DNA, con conseguente riduzione dell'integrità della doppia elica. Oltre a ciò il metabolismo degli IPA è spesso associato all'aumento dei livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno, alcune delle quali, come il radicale idrossilico, sono in grado di aggredire le macromolecole cellulari come il DNA, ossidandole (Ingelman-Sundberg e Hagbjörk 1982, Lemaire *et al.*, 1994).

Il fatto che dopo 5 mesi dalla fuoriuscita di petrolio, il danno registrato nei pesci campionati nel sito interessato (Aspholmarna) si sia ridotto di circa il 50% è probabilmente imputabile, oltre al ruolo svolto dai meccanismi di riparazione del DNA, al completo *turnover* degli eritrociti (Pandrangi *et al.*, 1995). Inoltre, a novembre, anche la concentrazione di metaboliti degli IPA nella bile in questi animali si era notevolmente ridotta.

Il fatto che pesci campionati nel sito 2 (Skalkorgarna), invece, non mostrassero lo stesso recupero può essere dovuto all'impatto dell'attività portuale, qui particolarmente concentrata, che comporta una condizione cronica di forte inquinamento chimico, sulla quale lo stress aggiuntivo della fuoriuscita di petrolio può non aver rappresentato un evento biologicamente significativo. Oppure si può anche ipotizzare che la presenza di alcuni contaminanti, come i metalli, nel sito di Skalkorgarna siano in grado di inibire il metabolismo degli IPA, riducendo la produzione di intermedi genotossici (Gorbi *et al.*, 2003).

La risposta apoptotica è stata, in generale, piuttosto bassa. Il Benzo-a-pirene, uno degli IPA più pericolosi, è infatti, in grado di esercitare la sua azione cancerogena proprio perché può danneggiare il materiale genetico prima che la cellula riesca a mettere in atto le sue difese, come l'induzione della cascata apoptotica. A questo proposito è interessante notare che il trattamento di esemplari di anguilla europea con una dose di Benzo-a-pirene pari a 1 mg/kg provoca un'induzione del meccanismo apoptotico comparabile con i risultati ottenuti in questo lavoro nei pesci campionati a luglio ad Aspholmarna, il sito interessato dalla fuoriuscita di petrolio (Nigro *et al.*, 2002).



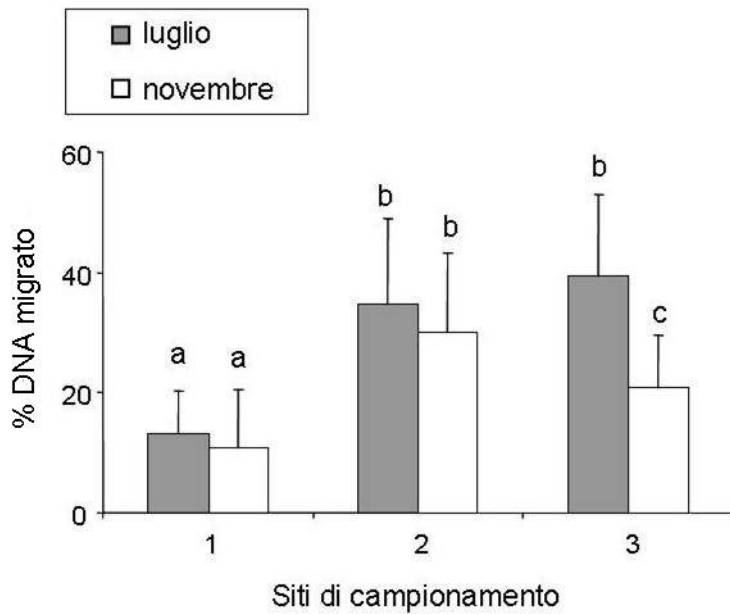


Figura 1: integrità del DNA nei pesci campionati a luglio e novembre 2003. Le lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi.

Sito 1 = Nordre älv, (sito di controllo) Sito 2 = Skalkorgarna (nel porto di Göteborg) Sito 3 = Aspholmarna (sito interessato dalla perdita di petrolio).

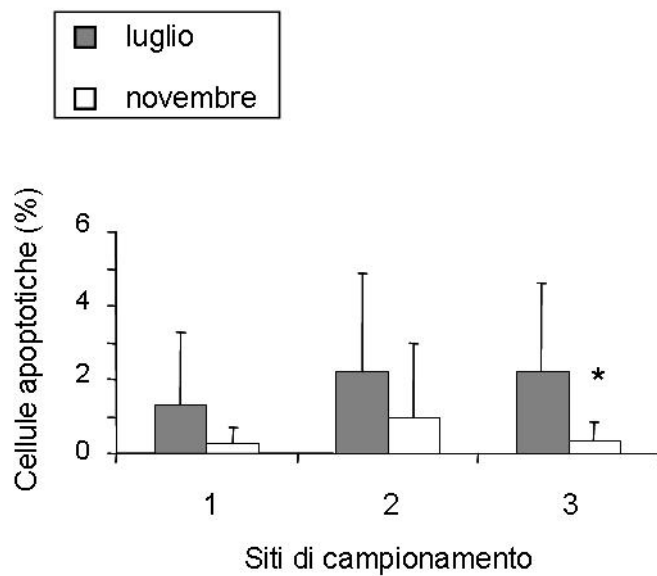


Figura 2: percentuale di cellule apoptotiche in pesci campionati nei tre siti a luglio e novembre 2003.

\*p<0.05.

## b) Effetti dell'esposizione a tossine algali

I risultati di questo studio sono stati pubblicati nell'articolo: *I. Del Barga et al. / Marine Environmental Research 62 (2006) S283–S286*.

Le trote trattate con estratti algali hanno mostrato un aumento della frammentazione del DNA in termini di *single strand breaks* comparabili con quelli indotti dall'esposizione in vivo a 20 mg/kg di Benzo-a-pirene (fig. 3). Non sono stati invece osservati aumenti significativi nella presenza di tagli a doppio filamento (*double strand breaks, DBS*) o nella frequenza di cellule apoptotiche.

Un debole, ma non statisticamente significativo, incremento della percentuale di cellule micronucleate è stato registrato nei trattati con estratto algale rispetto ai controlli (fig. 4).

I parametri antiossidanti analizzati non erano influenzati da 7 giorni di esposizione all'estratto algale.

Un debole aumento nell'attività dell'enzima EROD nei pesci esposti (fig. 5) fa pensare alla possibile presenza di ligandi del recettore Ah nell'estratto algale.

Questa ricerca, anche se preliminare, suggerisce la potenziale genotossicità degli estratti algali di *P. fucooides*, espressa in termini di rotture a singolo filamento, mentre l'assenza di un'alterazione dei sistemi antiossidanti sembra escluderne un'azione proossidante.

I risultati di questo studio, che è uno dei primi sulla potenziale genotossicità delle ficotossine (tossine algali), rendono auspicabile l'approfondimento sui rischi di un'esposizione cronica o di un'esposizione acuta a concentrazioni più elevate, in considerazione del fatto che l'essudato algale, nell'acqua, ha provocato lo stesso danno genetico primario di un noto cancerogeno, come è appunto il BaP iniettato per via intraperitoneale.

Questo scenario di esposizione è ancora più preoccupante per animali sessili come mitili o ostriche, che possono diventare un potenziale veicolo di sostanze genotossiche all'uomo, o ad altri vertebrati, attraverso l'alimentazione (Lemiere *et al.*, 2004 e 2005).

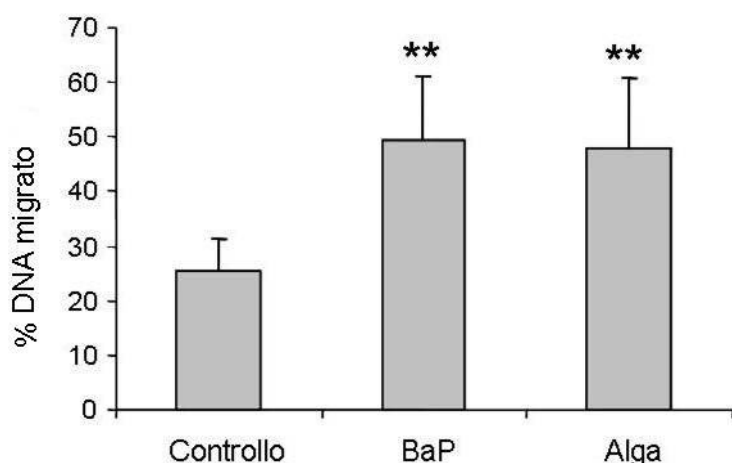


Figura 3: integrità del DNA negli eritrociti di trote esposte a 0.5% di estratto algale ed a 20 mg/kg di BaP. ANOVA \*\*  $p < 0.01$

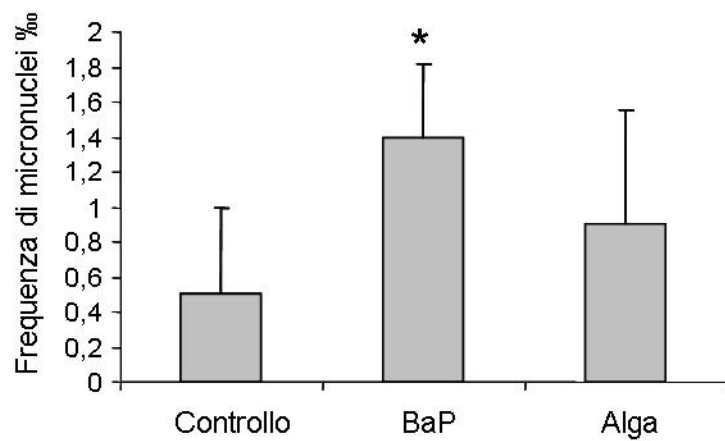


Figura 4: frequenza di micronuclei (‰) negli eritrociti di trote esposte a 0.5% di estratto algale ed a 20 mg/kg di BaP. ANOVA \*  $p < 0.05$

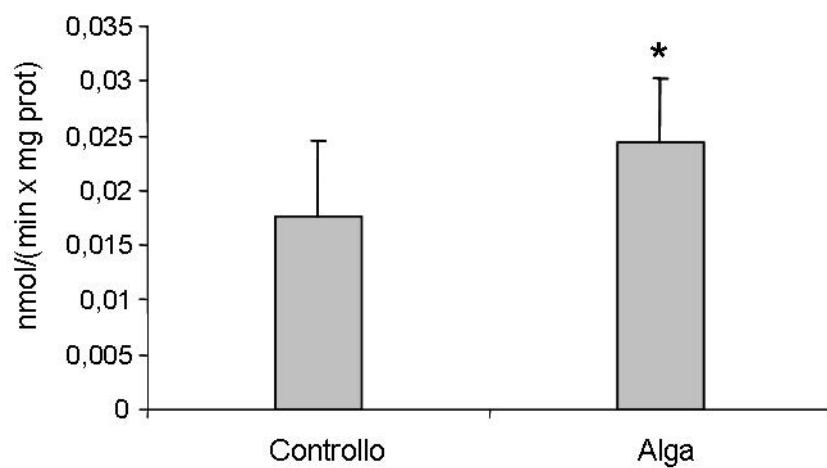


Figura 5: attività EROD in trote esposte a 0.5% di estratto algale. Mann-Whitney U test \*  $p < 0.05$ .

## 2 Esposizione cronica:

### a) Biomonitoraggio: coste della Toscana

Il sito di Forte dei Marmi, scelto come controllo, si differenzia nettamente dagli altri per un'elevata integrità genetica e lisosomale.

Diversamente, i mitili campionati nei due siti industriali e presso la foce del fiume Cecina mostrano un livello medio alto di danno genetico (fig. 6), accompagnato dall'alterazione delle membrane lisosomali (fig. 8). Per quanto riguarda la frequenza di cellule micronucleate (fig. 7) gli animali più compromessi sembrano quelli campionati alla foce del Cecina, lo stesso per quanto riguarda l'accumulo di lipofuscina (fig. 9) nei lisosomi della ghiandola digestiva.

I risultati riguardanti il bioaccumulo di metalli pesanti sono illustrati nella tabella 1.

La rilevante perdita di integrità del DNA nei tre siti (Foce del Cecina, Rosignano e Scarlino) è paragonabile a quella misurata nel Porto petroli di Genova (Regoli *et al.*, 2004) e potrebbe essere messa in relazione all'elevato accumulo di metalli pesanti notoriamente genotossici come il cromo e mercurio o anche di metalli di transizione come ferro e rame riconosciuti come capaci di catalizzare la formazione del radicale ossidrilico attraverso la reazione di Fenton (Winston *et al.*, 1996) radicale che, come noto, può influenzare direttamente la stabilità del DNA (ossidazione delle basi azotate, *strand breaks*).

I lisosomi hanno un ruolo importante nella compartimentazione cellulare di metalli pesanti e xenobiotici e spesso sono bersaglio della tossicità di queste sostanze (Lowe e Moore, 1979, Winston e Di Giulio 1991), ed in questo studio è stata misurata una generalizzata alterazione del sistema lisosomale sia negli emociti circolanti sia nelle cellule della ghiandola digestiva. L'elevato accumulo di metalli di transizione come ferro e rame, inoltre, suggerisce il coinvolgimento di processi ossidativi nell'induzione delle alterazioni lisosomali osservate in questo studio, come confermano i dati riguardanti l'alterazione dell'attività di alcuni enzimi antiossidanti o della concentrazione di alcuni *scavenger* cellulari (dati non mostrati) come glutathione reduttasi, glutathione – S – transferasi la cui attività risulta ridotta ( $p < 0.01$ ) rispetto al controllo, o la concentrazione di glutathione totale anch'esso ridotto rispetto al controllo ( $p < 0.01$ ).

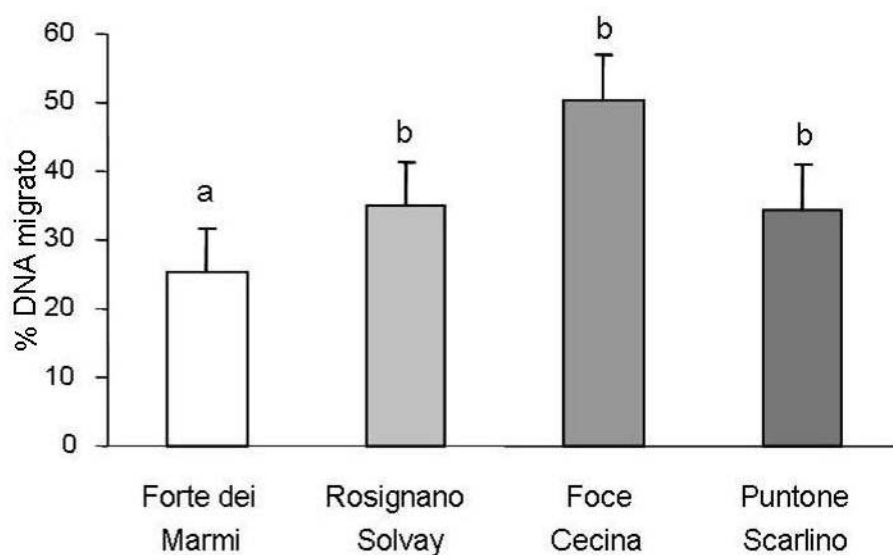


Figura 6: integrità del DNA, valutata con il *Comet assay* in cellule branchiali di mitili campionati nei siti oggetto di studio ed in un sito di riferimento. Le lettere indicano differenze significative tra le medie:  $p(a/b) < 0.01$ ;  $p(a/c) < 0.001$

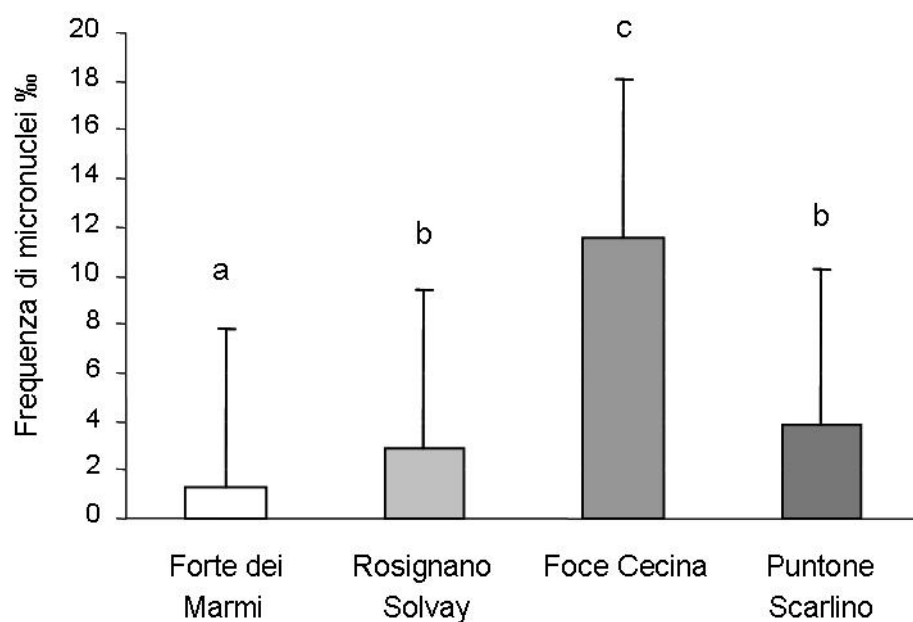


Figura 7 frequenza di micronuclei (‰) in cellule branchiali di mitili campionati nei siti oggetto di studio ed in un sito di riferimento. Le lettere indicano differenze significative tra le medie:  $p(a/b) < 0.001$ .

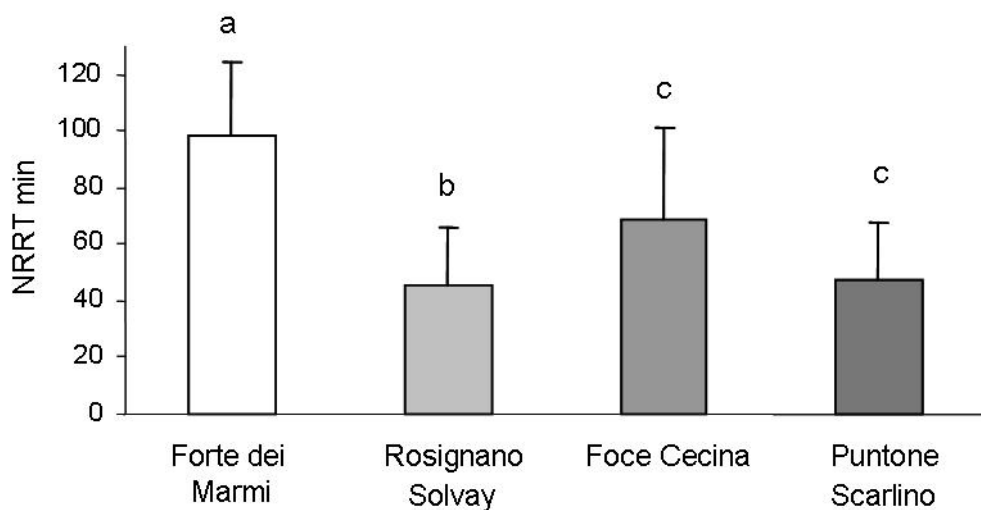


Figura 8: tempo di ritenzione del rosso neutro (min.) in emociti di mitili campionati nei siti oggetto di studio ed in un sito di riferimento. Le lettere indicano differenze significative tra le medie:  $p(a/b) < 0.05$ ;  $p(a/c) < 0.01$ .

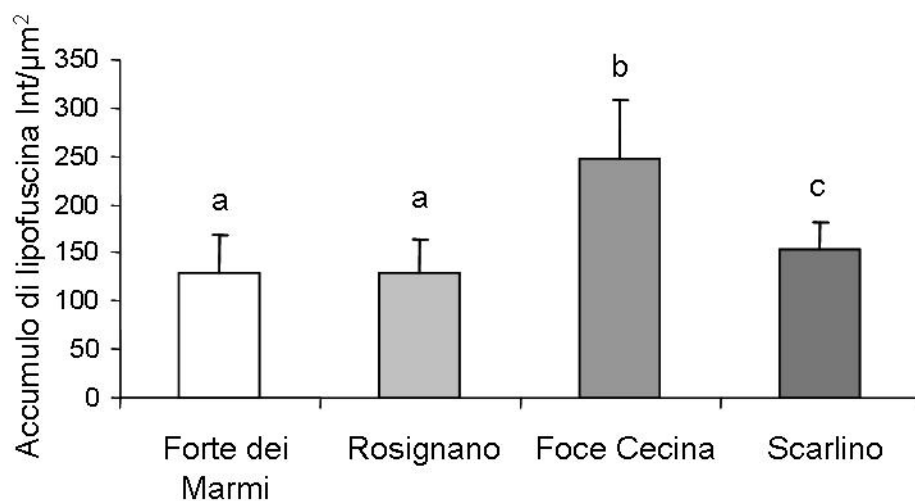


Figura 9: accumulo di lipofusina (Int/μm²) in cellule digestive di mitili campionati nei siti oggetto di studio ed in un sito di riferimento. Le lettere indicano differenze significative tra le medie:  $p(a/b) < 0.01$ ;  $p(a/b) < 0.05$ .

**Tabella 1** Concentrazione ( $\mu\text{g/g}$  peso secco) dei metalli nella ghiandola digestiva di mitili campionati nei siti oggetto di studio. *MRT = Multiple Range Test.*

Sito	As	MRT $p < 0,05$		Cu	MRT $p < 0,05$		
Forte dei Marmi	38,88 $\pm$ 4,34		X	13,6 $\pm$ 1,59	X		
Rosignano Solvay	41,62 $\pm$ 7,14		X	13,61 $\pm$ 1,17	X		
Foce del Cecina	22,61 $\pm$ 9,82	X		26,23 $\pm$ 1,58		X	
Puntone Scarlino	38,52 $\pm$ 6,4		X	23,05 $\pm$ 1,33			X
Sito	Fe	MRT $p < 0,05$		Hg	MRT $p < 0,05$		
Forte dei Marmi	1910 $\pm$ 385	X		0,087 $\pm$ 0,018	X		
Rosignano Solvay	2576 $\pm$ 495		X	0,440 $\pm$ 0,067			X
Foce del Cecina	3211,4 $\pm$ 327,8		X	0,148 $\pm$ 0,018		X	
Puntone Scarlino	2728 $\pm$ 561		X	0,463 $\pm$ 0,031			X
Sito	Pb	MRT $p < 0,05$		Mn	MRT $p < 0,05$		
Forte dei Marmi	2,85 $\pm$ 0,47	X		34,89 $\pm$ 6,26	X		
Rosignano Solvay	3,01 $\pm$ 0,27	X		54,6 $\pm$ 8,00		X	
Foce del Cecina	3,82 $\pm$ 1,87	X		66,14 $\pm$ 5,34		X	
Puntone Scarlino	11,58 $\pm$ 1,25		X	125,41 $\pm$ 28,77			X
Sito	Zn	MRT $p < 0,05$		Ni	MRT $p < 0,05$		
Forte dei Marmi	56 $\pm$ 8,46	X		11,98 $\pm$ 2,30	X		
Rosignano Solvay	77,03 $\pm$ 13,2		X	16,6 $\pm$ 1,72		X	
Foce del Cecina	73,94 $\pm$ 15,29		X	42,45 $\pm$ 2,48			X
Puntone Scarlino	87,03 $\pm$ 8,46		X	14,29 $\pm$ 2,59	X	X	
Sito	Cd	MRT $p < 0,05$		V	MRT $p < 0,05$		
Forte dei Marmi	0,595 $\pm$ 0,092	X		11,40 $\pm$ 1,22	X		
Rosignano Solvay	1,55 $\pm$ 0,227		X	10,85 $\pm$ 2,31	X	X	
Foce del Cecina	1,39 $\pm$ 0,32		X	7,81 $\pm$ 1,52		X	
Puntone Scarlino	0,73 $\pm$ 0,125	X		21,82 $\pm$ 3,16			X
Sito	Cr	MRT $p < 0,05$					
Forte dei Marmi	7,28 $\pm$ 1,09	X					
Rosignano Solvay	10,3 $\pm$ 2,14		X				
Foce del Cecina	10,3 $\pm$ 2,06		X				
Puntone Scarlino	7,64 $\pm$ 1,83	X	X				

Il sito di Puntone Scarlino fu oggetto di indagini tra il 1992 e il 2000. I risultati evidenziarono una contaminazione da Fe, Cu, As, Se, Mn e Pb derivanti da un dilavamento delle ceneri di pirite accumulate nel retroterra (Regoli ed Orlando 1994), una marcata alterazione del sistema antiossidante e la perdita di stabilità delle membrane lisosomiali (Regoli 1992, 2000; Regoli e Principato 1995). A circa 10 anni di distanza dalle prime indagini e successivamente alla riconversione dei processi produttivi che si erano resi responsabili dell'inquinamento, lo stato di salute del bioindicatore *Mytilus galloprovincialis* mostra ancora i segni di una situazione ambientale critica in termini di funzionalità del comparto lisosomale. Al contrario, se si vanno a mettere a confronto i risultati sul bioaccumulo e sulla funzionalità del sistema antiossidante da noi registrati (tabella 2) con i dati pregressi sopra citati, si nota un discreto miglioramento.

**Tabella 2** Confronto tra i dati ottenuti nel presente lavoro (2006) ed i dati pregressi presenti in letteratura (Regoli ed Orlando 1994; Regoli 1992, 2000; Regoli e Principato 1995).

As µg/g peso secco			Cu µg/g peso secco		
	<i>Forte dei Marmi</i>	<i>Scarolino</i>		<i>Forte dei Marmi</i>	<i>Scarolino</i>
1995	11.2 ± 3.05	43.7 ± 3.15	1995	18.3 ± 1.96	26.9 ± 4.55
2006	38.88 ± 4.34	38.52 ± 6.4	2006	31.16 ± 1.59	23.05 ± 1.33
Mg µg/g peso secco			Fe µg/g peso secco		
	<i>Forte dei Marmi</i>	<i>Scarolino</i>		<i>Forte dei Marmi</i>	<i>Scarolino</i>
1995	28 ± 4.08	138 ± 12.5	1995	1451 ± 433	4846 ± 793
2006	34.89 ± 6.26	125.41 ± 28.77	2006	1910 ± 385	2728 ± 561
Zn µg/g peso secco			Pb µg/g peso secco		
	<i>Forte dei Marmi</i>	<i>Scarolino</i>		<i>Forte dei Marmi</i>	<i>Scarolino</i>
1993			1993		~150±30
1995	76.4 ± 4.64	142 ± 14.8	1995	4.12 ± 0.92	91.9 ± 10.1
2006	56 ± 8.46	87.03 ± 13.2	2006	2.85 ± 0.47	11.58 ± 1.25
Cr µg/g peso secco			Ni µg/g peso secco		
	<i>Forte dei Marmi</i>	<i>Scarolino</i>		<i>Forte dei Marmi</i>	<i>Scarolino</i>
1995	5.5 ± 1.33	5.08 ± 1.47	1995	7.4 ± 0.86	8.42 ± 1.56
2006	7.28 ± 1.09	7.64 ± 1.83	2006	11.98 ± 2.3	14.29 ± 2.59
Tosc-OH. Utosc-a /mg proteine			Glutazione riduttasi nmol/min/mgprt		
	<i>Forte dei Marmi</i>	<i>Scarolino</i>		<i>Forte dei Marmi</i>	<i>Scarolino</i>
2000	360 ± 29.4	235 ± 36.3	1995	43.8 ± 2.3	43.2 ± 2
2006	314,25 ± 48,83	448,74 ± 123,5	2006	27,76 ± 6,34	21,88 ± 3,4
Catalasi µmol/min/mgprt			Glutazione S transferasi nmol/min/mgprt		
	<i>Forte dei Marmi</i>	<i>Scarolino</i>		<i>Forte dei Marmi</i>	<i>Scarolino</i>
1995	44.9 ± 4.74	57.0 ± 15.7	1995	77.1 ± 13.7	85.0 ± 14.4
2006	32,29 ± 12,54	30,9 ± 10,81	2006	182,96 ± 39,99	140,35 ± 20,8
Tosc-R00. Utosc-a mg proteine			Glutazione perossidasi-CHP nmol/min/mgprt		
	<i>Forte dei Marmi</i>	<i>Scarolino</i>		<i>Forte dei Marmi</i>	<i>Scarolino</i>
2000	525 ± 58.5	410 ± 38.2	1995	7.49 ± 1.78	8.13 ± 0.84
2006	448,26 ± 68.13	609,7 ± 138.28	2006	10,86 ± 2,82	19,12 ± 11,83
Glutazione µmol/g					
	<i>Forte dei Marmi</i>	<i>Scarolino</i>			
1995	1.28 ± 0.07	0.58 ± 0.08			
2006	1,7 ± 0,22	0,97 ± 0,07			

Anche il sito di Rosignano Solvay ha una lunga storia di contaminazione legata all'immissione pregressa ed attuale di sostanze inorganiche (particolarmente Hg) ed organiche. Tuttavia in questo caso non esistono dati pregressi su *biomarker* da confrontare con i dati attuali.

Anche la marcata alterazione dei parametri biologici registrata alla foce del fiume Cecina è verosimilmente da porsi in relazione con il forte carico ambientale di metalli bioaccumulabili, tra i quali Cu, Fe, Cr, Ni, Hg. Gli elevati livelli di metalli riscontrati nei mitili della foce sono, almeno



in parte, ascrivibili alla natura geologica del bacino fluviale ricco di rocce ofiolitiche. Tuttavia nella porzione mediana del suo corso, il fiume Cecina ha subito l'impatto di attività estrattive e processi industriali, che verosimilmente si ripercuotono anche a valle, potendo, quindi, interessare anche la foce.

## **b) Utilizzo di animali trapiantati nel monitoraggio dell'ambiente marino costiero: foce del fiume Cecina**

I risultati di questo studio sono stati pubblicati nell'articolo: *Nigro et al./Aquatic Toxicology 77 (2006) 339-347*.

Dopo 30 giorni dal trapianto alla foce del fiume, i mitili avevano raggiunto lo stesso grado di frammentazione del DNA degli animali appartenenti alla popolazione nativa, mentre gli animali di controllo trapiantati all'isola di Palmaria mostravano un grado di frammentazione del DNA significativamente più basso ( $p < 0.01$ ) (fig. 10).

La frequenza di cellule micronucleate (fig. 11) nei mitili trapiantati era raddoppiata rispetto ai controlli ( $p < 0.05$ ) ma non aveva raggiunto i livelli mostrati dagli animali della popolazione naturale, che erano quattro volte più alti rispetto ai controlli ( $p < 0.001$ ).

I mitili trapiantati alla foce del Cecina mostravano un'alterazione generalizzata del sistema lisosomale. La stabilità della membrana, valutata con il tempo di ritenzione del rosso neutro (fig. 12), era notevolmente ridotta rispetto ai controlli, sia nei mitili trapiantati ( $p < 0.05$ ) che in quelli appartenenti alla popolazione naturale ( $p < 0.01$ ). Inoltre gli individui campionati alla foce del fiume mostravano un aumento nell'accumulo di lipofuscina (fig. 13) nei lisosomi secondari della ghiandola digestiva, aumento statisticamente significativo ( $p < 0.01$ ) nei mitili appartenenti alla popolazione naturale rispetto ai controlli. L'esame ultrastrutturale delle cellule digestive (fig. 14) ha dimostrato che i lisosomi secondari dei mitili nativi del Cecina erano significativamente ( $p < 0.05$ ) maggiori rispetto ai controlli, probabilmente a causa di un aumento dei fenomeni di fusione lisosomale.

Gli animali trapiantati alla foce del fiume mostravano, dopo 4 settimane un generale aumento nei propri tessuti dell'accumulo di metalli presi in esame ad eccezione di arsenico, cadmio e piombo (tabella 3). In particolare, le concentrazioni di ferro, manganese, nichel, cromo e vanadio erano 5/10 volte più alte rispetto ai controlli, l'aumento di mercurio e rame è stato meno marcato, ma comunque significativo (circa 2 e 4 volte superiore rispetto ai controlli).

I mitili della popolazione nativa mostravano concentrazioni simili a quelli trapiantati, con la sola eccezione di rame e cromo, i cui livelli tissutali erano più alti negli animali trapiantati. Il piombo ha mostrato una tendenza opposta rispetto a quella degli altri elementi, con concentrazioni di circa il 50% più basse nei mitili nativi della foce sia rispetto ai trapiantati sia rispetto ai controlli,

probabilmente ciò imputabile ad una contaminazione da piombo nel sito di controllo (Isola di Palmaria).

Questi dati confermano che i mitili trapiantati equilibrano rapidamente i loro livelli di metalli tissutali rispetto alla loro biodisponibilità e l'utilità di questa metodica nel monitoraggio di aree contaminate da metalli (Regoli e Orlando 1994; Regoli *et al.*, 2004).

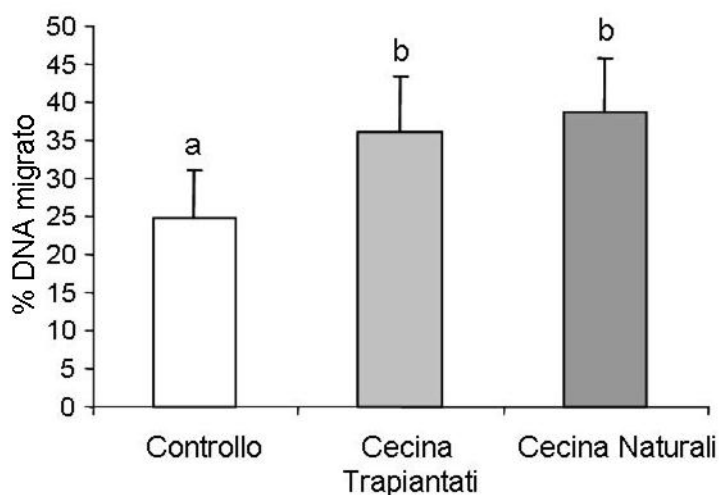


Figura 10: integrità del DNA, valutata con il *Comet* assay in cellule branchiali di mitili campionati alla foce del fiume Cecina ed in un sito di riferimento. Le lettere indicano differenze significative tra le medie:  $p(a/b) < 0.01$ .

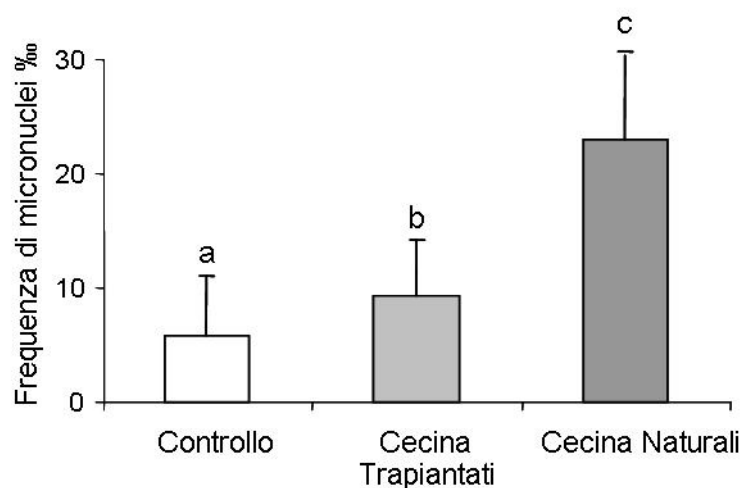


Figura 11: frequenza di micronuclei (‰) in cellule branchiali di mitili campionati alla foce del fiume Cecina ed in un sito di riferimento. Le lettere indicano differenze significative tra le medie:  $p(a/b) < 0.05$ ;  $p(a/c) < 0.01$ .

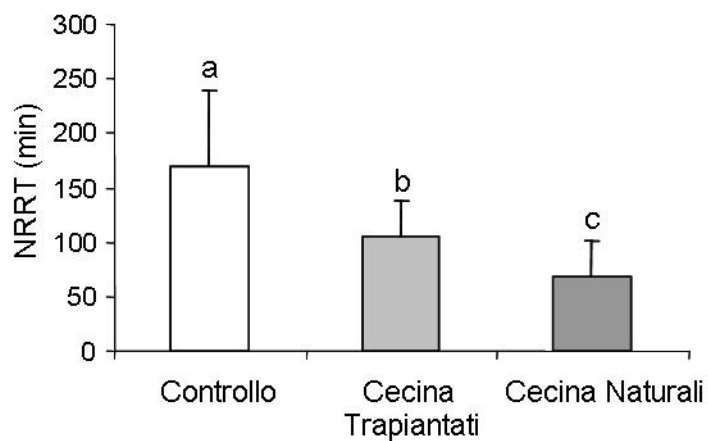


Figura 12: tempo di ritenzione del rosso neutro (min.) in emociti di mitili campionati alla foce del fiume Cecina ed in un sito di riferimento. Le lettere indicano differenze significative tra le medie:  $p(a/b) < 0.05$ ;  $p(a/c) < 0.01$ .

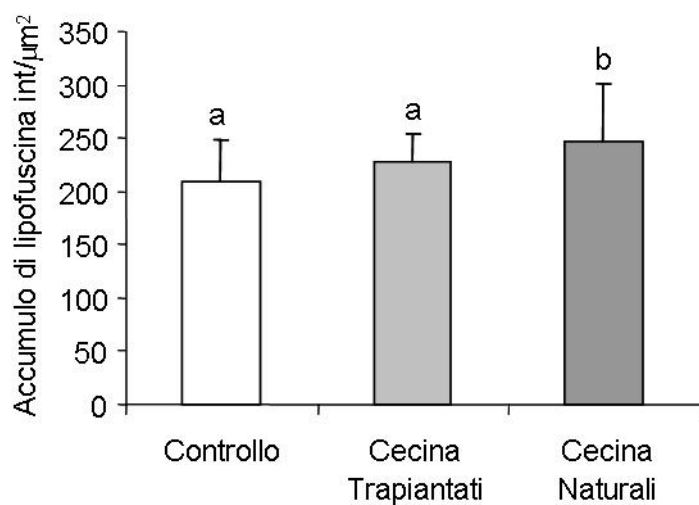


Figura 13: accumulo di lipofuscina (Int/μm²) in cellule digestive di mitili campionati alla foce del fiume Cecina ed in un sito di riferimento. Le lettere indicano differenze significative tra le medie:  $p(a/b) < 0.01$ .

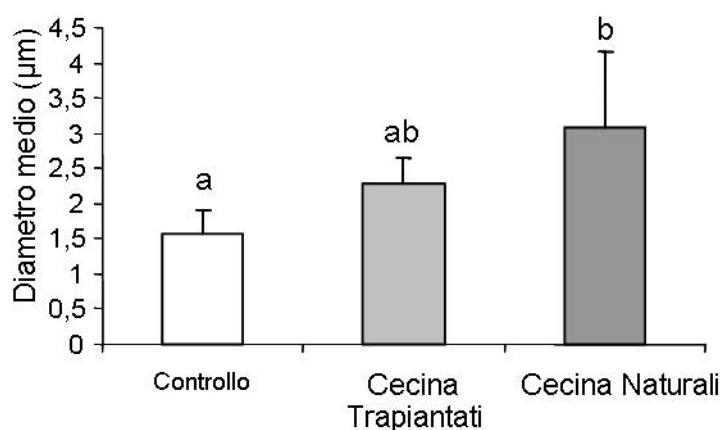


Figura 14: diametro lisosomale medio in cellule digestive di mitili campionati alla foce del fiume Cecina ed in un sito di riferimento. Le lettere indicano differenze significative tra le medie:  $p(a/b) < 0.05$ .

**Tabella 3** Concentrazione ( $\mu\text{g/g}$  peso secco) dei metalli nella ghiandola digestiva di mitili campionati nei siti oggetto di studio. *MRT = Multiple Range Test.*

Sito	As	p = n.s.		Cu	MRT p<0.001		
Controllo	14,74 ± 1,38			12,43 ± 0,17	X		
Foce del Cecina trap.	21,04 ± 4,73			34,74 ± 14,01			X
Foce del Cecina nativi	22,61 ± 9,82			26,23 ± 1,58		X	
Sito	Fe	MRT p<0,001		Cr	MRT p<0.001		
Controllo	258,34 ± 51,28	X		1,86 ± 0,58	X		
Foce del Cecina trap.	2887,73 ± 93,69		X	15,03 ± 4,33			X
Foce del Cecina nativi	3211,4 ± 327,8		X	10,3 ± 2,06		X	
Sito	Pb	MRT p<0,01		Mn	MRT p<0.001		
Controllo	8,14 ± 1,81	X		9,41 ± 1,63	X		
Foce del Cecina trap.	9,38 ± 0,91		X	68,39 ± 4,85		X	
Foce del Cecina nativi	3,82 ± 1,87		X	66,14 ± 5,34		X	
Sito	Zn	p = n.s.		Ni	MRT p<0.05		
Controllo	73,11 ± 12			4,28 ± 0,45	X		
Foce del Cecina trap.	116,11 ± 37			34,74 ± 14,01		X	
Foce del Cecina nativi	73,95 ± 15,29			42,45 ± 2,48		X	
Sito	Cd	p = n.s.		V	MRT p<0.001		
Controllo	0,84 ± 0,18			1,50 ± 0,13	X		
Foce del Cecina trap.	1,07 ± 0,41			7,71 ± 1,10		X	
Foce del Cecina nativi	1,39 ± 0,32			7,81 ± 1,52		X	
Sito	Hg	MRT p<0.01					
Controllo	0,11 ± 0,02	X					
Foce del Cecina trap.	0,17 ± 0,02		X				
Foce del Cecina nativi	0,15 ± 0,02		X				

Come già detto i lisosomi sono importanti nella compartimentazione di metalli pesanti e xenobiotici e spesso sono bersaglio della tossicità di queste sostanze ed anche in questo studio è stata misurata un' alterazione generalizzata del sistema lisosomale sia negli emociti circolanti sia nelle cellule della ghiandola digestiva. Il ruolo dei radicali dell'ossigeno nel promuovere il danno lisosomale e la formazione di lipofuscina è stato riportato da molti autori (Brunk *et al.*, 1992, Winston *et al.*, 1996, Regoli *et al.*, 1998). Inoltre, i ROS presenti sia all'interno sia all'esterno dei lisosomi possono essere responsabili della labilizzazione della membrana lisosomale e della successiva liberazione di enzimi idrolitici nel citosol portando a fenomeni di autofagia (Winston *et al.*, 1996, Brunk e Terman 2002). L'elevato accumulo di metalli di transizione come ferro e rame suggerisce, allora, il coinvolgimento di processi ossidativi nell'induzione delle alterazioni lisosomali osservate in questo studio.

E' ormai noto che anche il DNA può reagire con le specie reattive dell'ossigeno e con i prodotti della perossidazione lipidica; questa interazione può tradursi in una riduzione dell'integrità della doppia elica in termini di addotti, siti labili agli alcali e *strand breaks*.

L'ipotesi di una causa ossidativa sia per il danno ai lisosomi che per quello al DNA è supportata dalla correlazione significativa ( $p < 0.001$ ;  $b = - 3.53$ ;  $F = 104.17$ ) ottenuta confrontando la percentuale di DNA migrato misurato nelle cellule branchiali e il tempo di ritenzione del rosso neutro misurato negli emociti degli stessi animali (fig. 15).

L'andamento parallelo di alterazioni genotossiche e lisosomali è stato spesso riportato come segnale precoce di squilibrio tra le forze proossidanti e le difese antiossidanti (Regoli *et al.*, 2004, Winston e Di Giulio 1991).

I dati hanno mostrato che la frequenza di cellule micronucleate nei mitili trapiantati era raddoppiata dopo 30 giorni dal trapianto, mentre quella registrata nella popolazione naturale era fino a 4 volte superiore rispetto al controllo.

Questa differenza nella sensibilità tra mitili trapiantati e nativi si può spiegare con il fatto che i micronuclei sono una forma di danno genetico che appare evidente dopo la divisione cellulare e si accumula attraverso le divisioni successive. Di conseguenza l'aumentata frequenza di micronuclei rappresenta una risposta allo stress ambientale che si accumula con il tempo, per questo un solo mese di esposizione non è bastato ai mitili trapiantati per raggiungere i livelli di quelli cronicamente esposti all'ambiente contaminato del fiume Cecina.

Al contrario la valutazione degli *strand breaks* attraverso il *Comet assay*, fornisce un segnale più precoce di stress, ed infatti, ad un mese dal trapianto, i mitili traslocati avevano raggiunto un grado di frammentazione del DNA paragonabile a quello degli animali nativi.

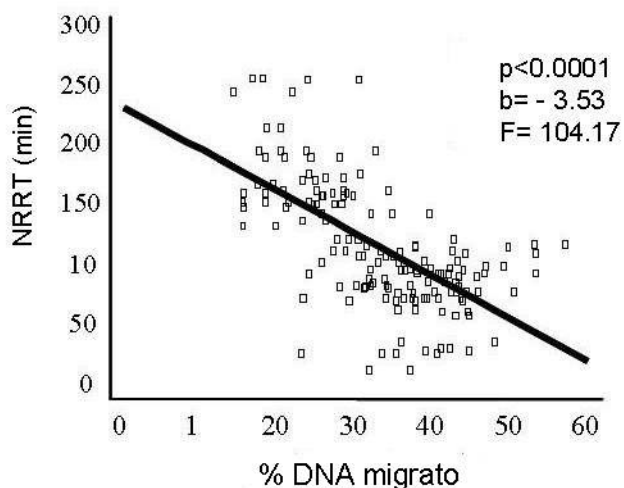


Figura 15: retta di regressione tra il tempo di ritenzione del rosso neutro e la migrazione del DNA nei mitili campionati (trapiantati, nativi e controllo)  $p < 0.0001$ ,  $b = - 3.53$ ,  $F = 104.17$

### c) Valutazione ecotossicologica di un ambiente fluviale: fiume Cecina

La tabella 4 mostra i risultati ottenuti dall'analisi dei *biomarker* di danno genetico e della percentuale di cellule apoptotiche nei cavedani pescati nei tre siti di interesse.

**Tabella 4** Percentuale di cellule apoptotiche in eritrociti di cavedani campionati nelle tre stazioni oggetto di studio. *MRT = Multiple Range Test.*

	% cellule apoptotiche	MRT $p < 0,05$	
<b>Controllo</b>	$0 \pm 0$	X	
<b>Ponteginori</b>	$0,25 \pm 0,5$	X	
<b>Saline di Volterra</b>	$6 \pm 4,36$		X

Entrambe le stazioni maggiormente influenzate da attività industriale hanno mostrato una perdita di integrità del DNA negli eritrociti del sangue periferico significativamente ( $p < 0.05$ ) maggiore rispetto al controllo (Masso delle Fanciulle) (fig. 16). Una correlazione positiva è stata riscontrata tramite analisi di regressione multipla tra il danno al DNA valutato con il *Comet* assay, e la concentrazione di mercurio nei tessuti dei pesci campionati.

La frequenza delle cellule micronucleate negli eritrociti dell'organo eritropoietico (rene) (fig. 18) è statisticamente più alta nella stazione di Saline di Volterra rispetto al controllo ( $p < 0,05$ ), mentre i pesci campionati nella stazione di Ponteginori mostrano una frequenza di micronuclei intermedia rispetto agli altri due siti.

Lo stesso dicasi per la frequenza di cellule micronucleate nel sangue periferico (rene) (fig. 17). In generale la risposta apoptotica è stata piuttosto bassa, ad eccezione del solo sito di Saline di Volterra.

Non si sono registrate differenze tra stazioni relativamente all'attività EROD e acetilcolinesterasica. Ciò suggerisce di escludere una contaminazione rilevante da parte di IPA, o composti organici in genere, e da pesticidi, e fa supporre che il danno genetico osservato sia maggiormente ascrivibile al carico di metalli pesanti (tabella 5). Infatti, in generale, i risultati hanno evidenziato che danno genetico ed accumulo di Hg sono più elevati nelle stazioni a valle del sito di immissione degli scarichi industriali (Ponteginori), rispetto ai siti collocati a monte. Inoltre, dall'analisi di regressione multipla la frequenza di micronuclei nel rene cefalico, correla positivamente con la taglia (lunghezza) dei pesci e quindi con l'età ( $p = 0.01$ ;  $F = 6,6$ ;  $b = 0.03$ ), e con la concentrazione di mercurio nei loro tessuti ( $p = 0.0001$ ;  $F = 6.74$ ;  $b = 0.22$ ).

Insieme i dati sul danno genetico ottenuti con il test del micronucleo e con il *Comet* sembrano indicare che gran parte del danno osservato sia dovuto al forte carico di mercurio biodisponibile lungo il corso del fiume.

Maggiormente variabile nelle diverse stazioni risulta l'espressione dei geni per la vitellogenina nei maschi di cavedano. In tutte le stazioni sono stati campionati esemplari maschili che esprimevano la VTG (fig. 19), senza differenze di rilievo tra siti. Questo effetto estrogenico generalizzato resta al momento di difficile interpretazione. Possibili cause potrebbero essere ricercate nel fondo naturale elevato di metalli (dovuto alla composizione delle rocce ofiolitiche che abbondano nel bacino del Cecina) alcuni dei quali sono stati descritti come potenzialmente estrogenici. Tuttavia, non è da escludere la presenza di altre sostanze ad azione estrogenica, come, per esempio i fitoestrogeni (estrogeni naturali prodotti dalle piante). Nei pesci, il rene è l'organo responsabile dell'eritropoiesi e della filtrazione. A seguito dell'esposizione a tossine, gli eritrociti difettosi passano dal rene al sangue periferico, dal quale vengono rimossi dagli organi predisposti. Per questo motivo diversi autori hanno ipotizzato che l'esame degli eritrociti nel rene cefalico potrebbe rilevare in modo più sensibile e precoce la presenza di micronuclei rispetto al sangue periferico (Palhares e Koppe – Grisolia, 2002).

A questo proposito, nel nostro studio, non si sono registrate rilevanti differenze nella sensibilità del test del micronucleo effettuato su campioni di rene cefalico rispetto allo stesso test effettuato su campioni di sangue periferico. La frequenza di cellule micronucleate rimane, comunque, decisamente bassa con entrambe le metodiche, ma più che sufficiente a discriminare differenze tra siti più o meno contaminati. D'altra parte è ormai noto come la frequenza di cellule micronucleate nei pesci in genere sia piuttosto bassa (APAT Manuali e Linee Guida 32/2005). Per questo motivo ci pare di poter concludere che l'analisi del micronucleo nel sangue periferico sia una metodica appropriata e sufficiente per progetti di monitoraggio.

**Tabella 5** Concentrazione ( $\mu\text{g/g}$  peso secco) dei metalli nel fegato e nel muscolo di *L. cephalus* campionati nelle due stazioni oggetto di studio ed in un sito di controllo (Masso delle Fanciulle) lungo il corso del fiume Cecina. *MRT* = *Multiple Range Test*.

	<b>Cd muscolo</b>	<b>MRT p &lt; 0,0001</b>			<b>Cd fegato</b>	<b>MRT p &lt; 0,0001</b>		
<b>Controllo</b>	0,0078 $\pm$ 0,002		X		0,14 $\pm$ 0,087	X	X	
<b>Ponteginori</b>	0,0072 $\pm$ 0,002		X		0,152 $\pm$ 0,098		X	X
<b>Saline di Volterra</b>	0,0021 $\pm$ 0,002	X			0,027 $\pm$ 0,019	X		
	<b>Cr muscolo</b>	<b>MRT p &lt; 0,01</b>			<b>Cr fegato</b>	<b>MRT p = n.s.</b>		
<b>Controllo</b>	0,31 $\pm$ 0,196	X			0,293 $\pm$ 0,162			
<b>Ponteginori</b>	0,37 $\pm$ 0,138		X		0,134 $\pm$ 0,036			
<b>Saline di Volterra</b>	0,26 $\pm$ 0,112	X			0,112 $\pm$ 0,043			
	<b>Hg muscolo</b>	<b>MRT p &lt; 0,0001</b>			<b>Hg fegato</b>	<b>MRT p = 0,01</b>		
<b>Controllo</b>	1,02 $\pm$ 0,445	X			0,186 $\pm$ 0,027	X		
<b>Ponteginori</b>	1,95 $\pm$ 0,543			X	0,946 $\pm$ 0,644		X	
<b>Saline di Volterra</b>	1,52 $\pm$ 0,553		X		0,55 $\pm$ 0,221	X	X	

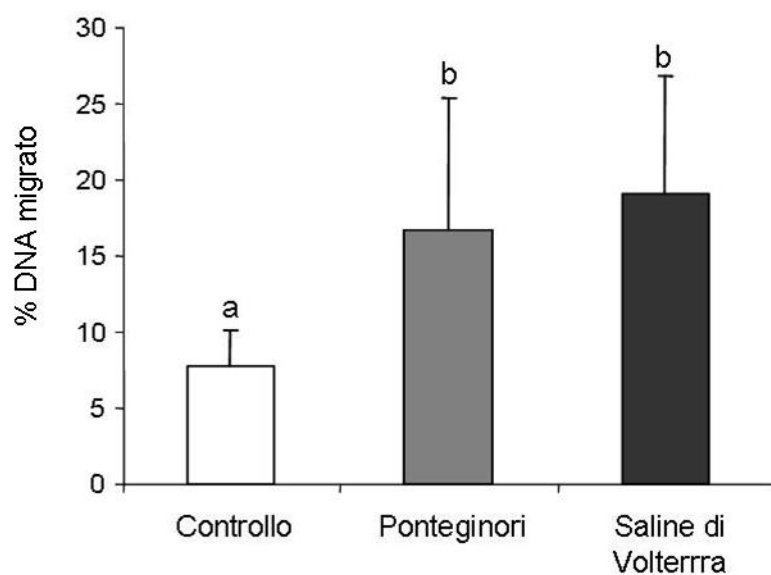


Figura 16: integrità del DNA, valutata con il *Comet* assay in eritrociti del sangue periferico di *L. cephalus* campionati nelle due stazioni oggetto di studio ed in un sito di controllo (Masso delle Fanciulle) lungo il corso del fiume Cecina. Le lettere indicano differenze significative tra le medie:  $p(a/b) < 0.001$ .



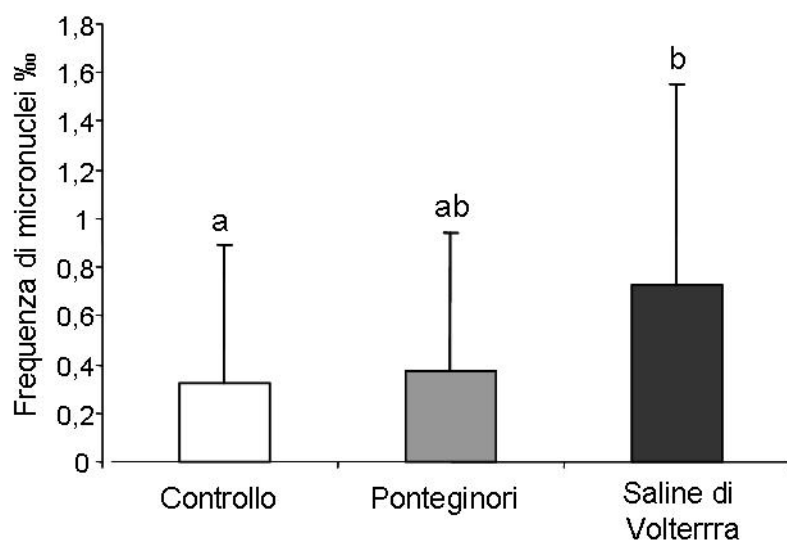


Figura 17: frequenza di micronuclei (%) in eritrociti del sangue periferico di *L. cephalus* campionati nelle due stazioni oggetto di studio ed in un sito di controllo (Masso delle Fanciulle) lungo il corso del fiume Cecina. Le lettere indicano differenze significative tra le medie:  $p(a/b) < 0.05$ .

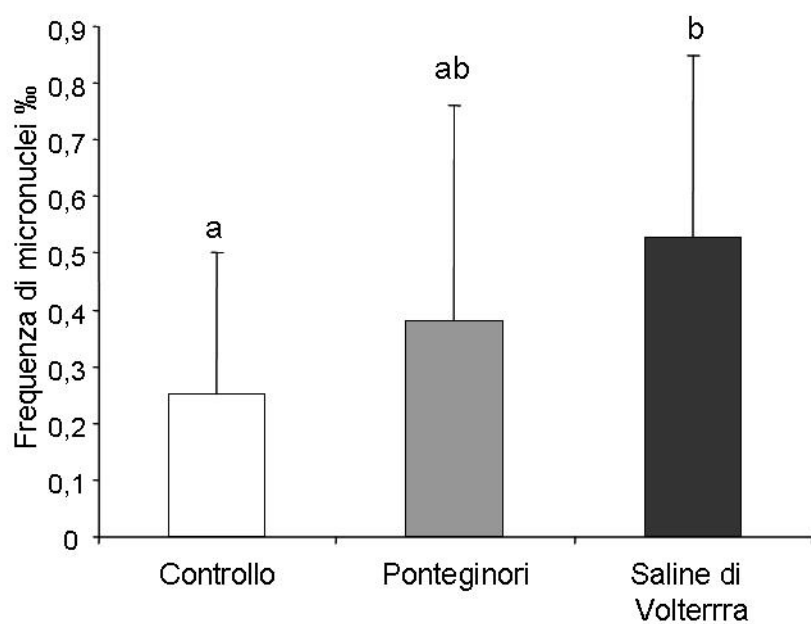


Figura 18: frequenza di micronuclei (%) in eritrociti del rene cefalico di *L. cephalus* campionati nelle due stazioni oggetto di studio ed in un sito di controllo (Masso delle Fanciulle) lungo il corso del fiume Cecina. Le lettere indicano differenze significative tra le medie:  $p(a/b) < 0.05$ .

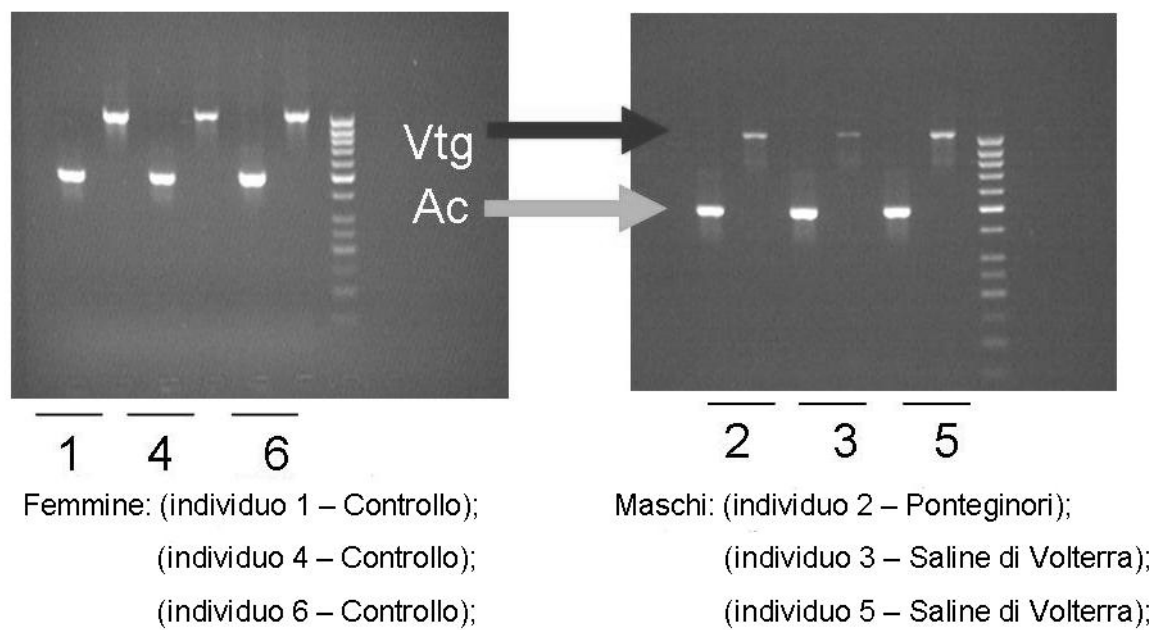


Figura 19: induzione del gene per la vitellogenina in esemplari di *L. cephalus* campionati nelle due stazioni oggetto di studio ed in un sito di controllo (Masso delle Fanciulle) lungo il corso del fiume Cecina. Vtg: vitellogenina; Ac: actina.

# Conclusioni

Le risposte cellulari prese in considerazione, in genere, sono state in grado di discriminare tra ambienti contaminati e non o tra animali esposti e controlli. La frammentazione del DNA e la diminuzione della stabilità delle membrane lisosomiali, valutate con il *Comet assay* ed il test del rosso neutro, rispettivamente, si sono dimostrate molto sensibili e precoci nel rilevare situazioni di stress e di allarme per lo stato di salute degli animali, ma, d'altro canto, proprio la loro notevole sensibilità li rende *biomarker* suscettibili a variabili naturali (stadio riproduttivo dell'animale, temperatura ecc) che vanno tenute nel giusto conto nell'interpretazione delle risposte osservate.

Il danno cromosomico valutato con il test del micronucleo e l'accumulo di lipofusina all'interno dei lisosomi sono risultati più efficaci per evidenziare gli effetti di una esposizione cronica, in quanto manifestazione di alterazioni che si accumulano nel tempo. In entrambi i casi, infatti si tratta di alterazioni non riparabili dell'omeostasi cellulare, se non attraverso l'eliminazione della cellula stessa. Per questo, al fine di ottenere una chiara idea dello stato di qualità ambientale di un determinato sito, si possono ritenere più utili esperimenti di monitoraggio che prevedano il campionamento, ove possibile, di individui appartenenti a popolazioni residenti, piuttosto che esperimenti di trapianto. È comunque vero che l'utilizzo di animali trapiantati garantisce una risposta più omogenea grazie alla minore variabilità genetica degli individui scelti (che, verosimilmente saranno caratterizzati dallo stesso tasso di crescita, stadio riproduttivo, oltre che da una storia pregressa comune). In questo caso, però, potrebbe essere opportuno prolungare i tempi di esposizione.

Per quanto riguarda il rilevamento dell'esposizione a contaminanti ad azione estrogenica la generalizzata espressione dei geni delle vitellogenina in pesci di sesso maschile nel bacino del fiume Cecina (anche in stazioni di campionamento prive di apporti inquinanti) evidenzia la possibilità che l'elevato fondo naturale di metalli possa essere responsabile degli effetti estrogenici osservati. Questo risultato richiama anche la necessità di ulteriori approfondimenti, alla luce del fatto che le acque del bacino del Cecina vengono utilizzate per uso potabile e quindi potrebbero rappresentare un rischio potenziale per la salute umana.

La rilevazione di un chiaro effetto genotossico associato all'esposizione ad estratti algali suscita interesse e preoccupazione per la possibilità che tossine naturali di derivazione algale possano raggiungere l'uomo attraverso il consumo di organismi accumulatori come i molluschi filtratori. Per questo sono da ritenere necessari ulteriori studi con concentrazioni, tempi di esposizione, bioindicatori e, magari anche specie algali differenti.

## Riferimenti Bibliografici

- Aas E., Beyer J., Goksøyr A. (2000) - Fixed wavelength fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in fish: an evaluation of compound specificity, inner filter effect and signal interpretation. *Biomarkers* 5: 9-23.
- Adamec E., Mohan P. S., Cataldo A. M., Vonsattel J. P., Nixon R. A. (2000). Up-regulation of the lysosomal system in experimental models of neuronal injury: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience* 100: 663–675.
- Ahnstrom G., Erixon K. (1973). Radiation induced strand breakage in DNA from mammalian cells. Strand separation in alkaline solution. *Radiat. Biol.*, 23: 285-289.
- Albertini R. J., Anderson D., Douglas G. R., Hagmar L., Hemminki K., Merlo F., Natarajan A. T., Norppa H., Shuker D. E. G., Tice R., Warers M. D., Aitio A. (2000). IPCS guidelines for monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat. Res.*, 463: 111-172.
- Alnemri E. S., Livingstone D. J., Nicholson D. W., Salvesen G., Thornberry N. A., Wong W. W., Yuan J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87: 171.
- APAT. Manuali e Linee Guida 32/2005. Valutazione della genotossicità di inquinanti in ambienti acquatici: messa a punto di metodi per l'esecuzione del test del micronucleo in eritrociti di specie ittiche. APAT (agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici).
- ATSDR. Toxicological profile for cadmium. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 1998.
- ATSDR. Toxicological profile for lead. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 1998.
- ATSDR. Toxicological profile for mercury. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 1998.
- Bancroft J.D. and Stevens A. (1982). *Theory and practice of histological techniques*, Ed. 2 Churchill Livingstone, Edinburgh & London, UK.
- Barucca M., Canapa A., Olmo E., Regoli F. (2005). Analysis of vitellogenin gene induction as a valuable biomarker of estrogenic exposure in various Mediterranean fish species. *Environ. Res.* 101(1):68-73.
- Bauman J. G. J., Wiegant J., Borst P., Van Duijn P. (1980). A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridisation of fluorochrome- labelled RNA. *Exp Cell Res.*, 138: 485-490.

- Beal M. F. (1996). Mitochondria, free radicals, and neurodegeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6: 661–666.
- Beckman K. B., Ames B. N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 78: 547–581.
- Belpaeme K., Delbeke K., Zhu L., Kirsh-Volders M. (1996). Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and in vivo alkaline comet assay. *Mutagenesis*, 11: 485-492.
- Bi X., Zhou J., Lynch G. (1999). Lysosomal protease inhibitors induce meganeurites and tangle-like structures in entorhinohippocampal regions vulnerable to Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 158: 312– 327.
- Birnboim H. C., Jevcak J. J. (1981). Fluorimetric method for rapid detection of DNA strand breaks in human white blood cells produced by low doses of radiation. *Cancer Res.*, 41: 1889-1892.
- Blakely W. F., Ward J. F., Joiner E. I. (1982). A quantitative assay of deoxyguanosine strand breaks and their repair in mammalian cells. *Anal. Biochem.*, 124: 125-133.
- Borenfreund E., Puerner J.A. (1984) Toxicology determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett* 24: 119.
- Bowman C.J., Kroll K.J., Hemmer M.J., Folmar L.C., Denslow N.D. (2000). Estrogen induced vitellogenin mRNA and protein in sheepshead minnow (*Cyprinodon variegates*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 120: 300 – 313.
- Brun A., Brunk U. (1970). Histochemical indications for Lysosomal localization of heavy metals in normal rat brain and liver. *J. Histochem. Cytochem.* 18: 820–827.
- Brunk U. T., Jones C. B., Sohal R. S. (1992). A novel hypothesis of lipofuscinogenesis and cellular aging based on interactions between oxidative stress and autophagocytosis. *Mutat. Res.* 275: 395–403.
- Brunk U.T., Terman A. (2002). Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 611–619.
- Carson D. A., Seto S., Wasson D. B., Carrera C. J. (1986). DNA strand breaks, Nad metabolism, and programmed cell death. *Exp. Cell Res.*, 164: 273-281.
- Cajaraville M.P., Robledo Y., Etxeberria M., Marigomez I. (1995). Cellular biomarkers as useful tools in the biological monitoring of environmental pollution: molluscan digestive lysosomes. In: Cajaraville M.P. (Ed.). *Cell Biology In Environmental Toxicology*. University of Basque Country Press Service, Biblio: 29 – 55.
- Choucroun P., Gillet D., Dorange G., Sawicki B., Dewitte J. D. (2001). Comet assay and early apoptosis. *Mutat. Res.*, 478: 89-96.
- Cohen J. J., Duke R. C. (1992). Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 10: 267-293.

- Colborn T., vom Saal F.S., Soto A.M. (1993). Developmental effect of endocrine disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 101: 378 – 384.
- Collins V. P., Arborgh B., Brunk U., Schellens J. P. (1980). Phagocytosis and degradation of rat liver mitochondria by cultivated human glial cells. *Lab. Invest.* 42: 209–216.
- Cook P. R., Brazell I. A. (1978). Spectrofluorometric measurements of the binding of ethidium to superhelical DNA from cell nuclei. *Eur. J. Biochem.*, 84: 465-477.
- Connor M. S. (1984). Fish/sediment concentration ratios for organic compounds. *Envir. Sci. Technol.*, 18: 31-35.
- Del Barga I., Frenzilli G., Scarcelli V, Ghezzi C., Cantafora E., Badesso A., Sturve J., Förlin L., Nigro M (2005). Danno al DNA valutato con il Comet assay in *Zoarcetes viviparus* pescati nel porto di Göteborg. *Biol. Mar. Medit.* 12 (1): 664 – 667.
- Depledge M. H. (1989). The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In Depledge M. H.: *The rational basis for detection of early effects of marine pollutants using physiological indicators*. AMBIO, 18: 301.
- Depledge M. H. (1994). The rational basis for use of biomarkers as ecotoxicological tools. In Fossi, M.C., Leonzio, C.: *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*. Lewis Publishers, CRC Press, US: 271-295.
- Domouhtsidou, G.P., Dimitriadis, V.K. (2001). Lysosomal and lipid alterations in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.) as biomarkers of environmental stress. *Environ. Pollut.* 115, 123–137.
- Elia M. C., Storer R. D., McKelvey T. W. (1994). Rapid DNA degradation in primary rat hepatocytes treated with diverse cytotoxic chemicals: analysis by pulsed field gel electrophoresis and implications for alkaline elution assay. *Environ. Mol. Mutagen.*, 24: 181-191.
- Epe B. (1995). DNA damage profiles induced by oxidizing agents. *Rev Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 27: 223-249.
- Espina N. G., Weiss P. (1995). DNA repair in fish from polluted estuaries. *Mar Environ Res*, 39 (1-4): 309-312.
- European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife. Weybridge December 2-4, 1996.
- Evans J. H. (1997). Historical perspectives on the development of the *in vitro* micronucleus test: a personal view. *Mutat. Res.*, 392: 5-10.
- Fairbairn D. W., Walburger D. K., Fairbairn J. J., O'Neil K. L. (1996). Key morphologic changes and DNA strand breaks in human lymphoid cells: Discriminating apoptosis from necrosis. *Scanning*, 18: 407-416.

- Fenech M. (1993): The cytokines-block micronucleus technique: a detailed description of method and its applications on genotoxicity studies in human populations. *Mutat. Res.*, 285: 35-44.
- Frenzilli G., Scarcelli V., Taddei F., Nigro M. (1999). Adaptation of SCGE for monitoring marine ecosystems. *Neoplasma*, 46: 6-7.
- Frenzilli G., Scancelli V., Del Barga I., Nigro M., Förlin L., Bolognesi C., Sturve J., (2004). DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Göteborg harbour. *Mutat. Res.* 552: 187-195
- Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, 119 (3): 493-501.
- Gedik C. M., Ewen S. W. B., Collins A. R. (1992). Single cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *It. J. Radiat. Biol.*, 62: 313-320.
- Goksøyr A., Förlin L. (1992). The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring, *Aquat. Toxicol.* 22: 287–312.
- Golstein P., Ojcius D. M., Young J. D. E. (1991). Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol. Rev.*, 121: 29-65.
- Gorbi S., Nigro M., Benedetti M., Fattorini D., Machella N., Pretti C., Vaccaro E., Gervasi P.G., Regoli F. (2003). Interactions between metabolism of metals and organic chemicals in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*, *European Society for Comparative Physiology and Biochemistry*, 22nd conference, Alessandria 2003, p. 102.
- Harman D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 211:298–300.
- Heddle J. A. Cimino M. C., Hayashi M., Romagna F., Shelby M. D., Tucker J. D., Vamparys P. H., MacGregor J. T. (1991). Micronuclei as index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environ. Molec. Mutagen.*, 18: 277-291.
- Halliwell B. (1992). Reactive Oxygen Species And Central Nervous System. *J. Neurochem.*, 59: 1609-1623.
- Hodgson E. (1994). Chemical and environmental factors affecting metabolism of xenobiotics. In Hodgson E., Levi P. E. (Editors): *Introduction to Biochemical Toxicology*, 2<sup>nd</sup> ed., Appleton and Lange, Norwalk, CT: 162-175.
- Hosokawa H., Ishii N., Ishida H., Ichimori K., Nakazawa, H., Suzuki K. (1994). Rapid accumulation of fluorescent material with aging in an oxygen-sensitive mutant mev-1 of *Caenorhabditis elegans*. *Mech. Ageing Dev.* 74:161–170.

- Ingelman-Sundberg M., Hagbjörk A.L. (1982). On the significance of the cytochrome P-450-dependent hydroxyl radical-mediated oxygenation mechanism, *Xenobiotica* 12: 673– 686.
- Kerr J. F. R., Wyllie A. H., Currie A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26: 239-257.
- Kikugawa K., Kato T., Beppu M., Hayasaka A. (1989). Fluorescent and cross-linked proteins formed by free radical and aldehyde species generated during lipid oxidation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 266: 345–357.
- Kizilian N., Wilkins R. C., Reinhardt P., Ferrarotto C., McLean J. R. N., McNamee J. P. (1999). Silver-stained comet assay for detection of apoptosis. *Biotechniques*, 27: 926-930.
- Koppen G., Verschaeve L. (1996). The alkaline comet test on plant cells: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. *Mutat. Res. (Environ. Mutagen. RS)*, 360: 193-200.
- Kurelec, B. (1993). The Genotoxic Disease Syndrome. *Mar. Environ. Res.*, 35: 341-348.
- Jolly R. D., Douglas B. V., Davey P. M., Roiri J. E. (1995). Lipofuscin in bovine muscle and brain: a model for studying age pigment. *Gerontology* 41:283–295.
- Lash L. H., Huenl S. E., Putt D. A. (2001). Apoptosis, necrosis, and cell proliferation induced by S-(1,2-dichlorovinyl)-L-cysteine in primary cultures of human proximal tubular cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 177: 1-16.
- Lemaire P., Matthews A., Förlin L., Livingstone D.R. (1994) Stimulation of oxyradical production of hepatic microsomes of flounder (*Platichthys flesus*) and perch (*Perca fluviatilis*) by model and pollutant xenobiotics, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26: 191–200.
- Lemiere S., Cossu-Leguille C., Bispo A., Jourdain M.J., Lanhers M.C., Burnel D., Vasseur P. (2004). Genotoxicity related to transfer of oil spill pollutants from mussels to mammals via food. *Environ Toxicol.* Aug;19(4):387-95.
- Lemiere S., Cossu-Leguille C., Bispo A., Jourdain M.J., Lanhers M.C., Burnel D., Vasseur P. (2005). DNA damage measured by the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in mammals fed with mussels contaminated by the 'Erika' oil-spill. *Mutat Res.* Mar 7;581(1-2):11-21.
- Lett J. T. (1981). Measurement of DNA single-strand breaks by sedimentation an alkaline sucrose gradients. In Freidberg E. C., Hanawalt P. C. (Eds): *DNA Repair: A Laboratory Manual in Research Procedures*, Marcel Dekker: 403-418.
- Lewis, P.R. (1977). Metal precipitation methods for hydrolytic enzymes. In: Glauert, M.A. (Ed.), *Staining Methods for Sectioned Material*. North Holland Publishing Company, Amsterdam, 137–223.



- Livingstone D. R. (2001). Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.*, 42 (8): 656-666.
- Lowe D.M., Moore M.N. (1979). The cytochemical distribution of Zn (Zn II) and iron (Fe III) in the common mussel *Mytilus edulis* and their relationship with lysosomes. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 59, 851–858.
- Lowe D.M., Moore M.N. & Evans B.M. (1992). Contaminant impact on interactions of molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from dab *Limanda limanda*. *Marine Mar Ecol. Prog. Ser.* 91: 135-140.
- Lowe D.M. & Pipe R.K. (1994). Contaminant induced lysosomal membrane damage on marine mussel digestive cells: an in vitro study. *Aquat. Toxicol.* 30, 357-365.
- Lowe D.M., Fossato V.U. & Depledge M.H. (1995a). Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Venice Lagoon: an in vitro study. *Mar Ecol. Prog. Ser.* 129: 189-196.
- Lowe D.M., Soverchia C. & Moore M.N. (1995b). Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels exposed to fluoranthene. *Aquat. Toxicol.* 33: 105-112.
- Lowe D.M., Fossato V.U. (2000). The influence of environmental contaminants on Lysosomal activity in the digestive cells of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon. *Aquat. Toxicol.*, 48: 75 – 85.
- Maccubbin, A.E. (1994). DNA adduct analysis in fish: laboratory and in field studies. In Malins D. C., Ostrander G. H. (Eds.): *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL: 267-294.
- Majno G., Joris I. (1995). Apoptosis, oncosis and necrosis: an overview of cell death. *Am. J. Pathol.*, 146: 3-15.
- Maranghi F., Mantovani A. (2003). I contaminanti ambientali con effetti endocrine: problemi e prospettive. *Not.Ist. Super. Sanità*: 16 (5): 3 – 11.
- Marigomez J.A, Vega M.M, Cajaraville M.P, Angulo E. (1989). Quantitative responses of the digestive-lysosomal system of winkles to sublethal concentrations of cadmium. *Cell. Mol. Biol.* 35(5): 555 - 562.
- Marigomez J. A., Soto M., Angulo E. (1991). Responses of winkles digestive cells and their lysosomal system to environmental salinity changes. *Cell. Mol. Biol.* 37(1): 29 - 39.
- Marks D., Fox R. M. (1991). DNA damage, poly(ADP-ribosyl)ation and apoptotic cell death as potential common pathway of cytotoxic drug action, *Biochem. Pharmacol.*, 42: 1859-1867.
- McCarthy J. F., Halbrook R. S., Shugart I. R. (1992). Conceptual strategy for design, implementation, and validation of a biomarker-based biomonitoring capability, ORNL/TM-11783, Oak Ridge National Laboratory.

- Matikainen T., Perez G. I., Jurisicova A., Pru J. K., Schlezinger J. J., Ryu H. Y., Laine J., Sakai T., Korsmeyer S. J., Casper R. F., Sherr D. H., Tilly J. L. (2001). Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazards environmental chemicals. *Nat. Genet.*, 28: 355-360.
- McConkey D. J., Hartzell P., Nicotera P., Wyllie A. H., Orrenius S. (1988). Stimulation of endogenous endonuclease activity in hepatocytes exposed to oxidative stress. *Toxicol. Lett.*, 42: 123-130.
- McKelvey-Martin V. J., Green M. H. L., Schmezer P., Pool-Zobel B. L., De Meo M. P., Collins A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat. Res.*, 288: 47-63.
- Meneghini R. (1988). Genotoxicity of active oxygen species in mammalian cells. *Mutat. Res.*, 195: 215-230.
- Migliore L., Cocchi L., Nesti C., Sabbioni E. (1999). Micronuclei assay and FISH analysis in human lymphocytes treated with six metal salts. *Environ. Mol. Mutagen.*, 34 (4): 279-284.
- Mitchelmore C. L., Chipman J. K. (1998). DNA strand breakage in aquatic organism and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat. Res.*, 399: 135-147.
- Moore T., Wang Y. L. (1947). Formation of fluorescent pigment in vitamin E deficiency. *Br. J. Nutr.* 1: 53–64.
- Moore M.N., Pipe R.K., Ferrar S.V., Thomson S., Donkin P. (1986). Lysosomal and microsomal responses in *Littorina littorea*: further investigations of environmental effects in the vicinity of the Sullom Voe Oil Terminal and the effects of experimental exposure to phenanthrene. In: Capuzzo J.M. and. Kester D.R (Ed.). *Oceanic Processes in Marine Pollution - Biological Processes and Waste in the Ocean*, Vol 1, Melbourne, Florida: Krieger Publishing: 89 – 96.
- Moore M.N. (1988). Cytochemical responses of the Lysosomal system and NADPH – ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 46: 81 -89.
- Moore M.N. (1990). Lysosomal cytochemistry in marine environmental monitoring. *Histochem J.*, 22 (4): 187 – 191.
- Moore M. N., Köhler A., Lowe D. M., Simpson M. G. (1994). An Integral Approach to cellular Biomarkers in Fish. In Fossi, M. C. e Leonzio, C.: *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*. Lewis Publishers, CRC Press, US: 171-197.
- Nicholson S. (1999). Cytological and physiological biomarker responses from green mussels *Perna viridis* (L.) transplanted to contaminated sites in Hong Kong coastal water. *Mar. Pollut. Bull.*, 39: 261 - 268.

- Munnell J. F., Getty R. (1968). Rate of accumulation of cardiac lipofuscin in the aging canine. *J. Gerontol.* 23:154–158.
- Nakano M., Gotoh S. (1992). Accumulation of cardiac lipofuscin depends on metabolic rate of mammals. *J. Gerontol.* 47: B126– B129;
- Nigro M., Frenzilli G., Scarcelli V., Gorbi S., Regoli F. (2002). Induction of DNA strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*, *Mar. Environ. Res.* 54: 517–520.
- Nigro M., Falleni A., Del Barga I., Scarcelli V., Lucchesi P., Regoli F., frenzilli G. (2006). Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: transplanted versus native mussels. *Aquat. Toxicol.* 77: 339 - 347
- Olive P. L., Frazer G., Banath J. P. (1993). Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human lymphoblast cells using the comet assay. *Radiat. Res.*, 136: 130-136.
- Östling O., Johanson K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123: 291-298.
- Pandrangi R., Petras M., Ralph S, Vrzoc M. (1995). Alkali single cell gel (comet assay) and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Environ. Mol. Mutagen.* 26: 345–356.
- Park J. K., Lee J. S., Lee H. H., Choi L. S., Park S. D. (1991). Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced single strand breaks is attributed to slower rejoining processes by DNA polymerase inhibitor, cytosine arabinoside in CHO-K1 cells. *Life Sci.*, 48: 1255-1261.
- Peakall D., Shugart L.R. (eds.) (1993). Biomarkers: Research and Application in the Assessment of Environmental Health, NATO ASI Series H: Cell Biology, 68, Springer-Verlag, Heidelberg.
- Palhares D. and Koppe Grisolia C. (2002). Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. *Genetics and Molecular Biology*, 25 (3) 281-284
- Preston G. A., Lang J. E., Maronpot R. R., Barrett J. C. (1994). Regulation of apoptosis by low serum in cells of different stages of neoplastic progression: enhanced susceptibility after loss of a senescence gene and decreased susceptibility after loss of a tumor suppressor gene. *Cancer Res.*, 54(15): 4214-4223.
- Reddy R. C., Scholz R. W., Thomas C. E., Massaro E. J. (1982). Vitamin E dependent reduced glutathione inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation. *Life Sci.*, 31: 571-579.
- Regoli F. (1992). Lysosomes responses as a sensitive stress index in biomonitoring heavy metal pollution. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 84: 63 – 69.

- Regoli F., Orlando E. (1994). Accumulation and subcellular distribution of metals (Cu, Fe, Mn, Pb and Zn) in the Mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis* during a field transplant experiment. *Mar. Pollut. Bull.* 28, 592–600.
- Regoli F., Principato G. (1995). Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 31, 143–164.
- Regoli F., Nigro M., Orlando E. (1998). Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallops *Adamussium colbecki*. *Aquat. Toxicol.* 40, 375–392.
- Regoli F., Winston G. W. (1999). Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxynitrite, peroxy radicals, and hydroxyl radicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 156(2): 96-105.
- Regoli F. (2000). Total oxiradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquat. Toxicol.* 50: 351 – 361.
- Regoli F., Winston G.W., Gorbi S., Frenzilli G., Nigro M., Corsi I., Focardi S. (2003) Integrating enzymatic responses to organic chemical exposure with total oxyradical absorbing capacity and DNA damage in the European eel *Anguilla anguilla*, *Environ. Toxicol. Chem.* 22 2120–2129.
- Regoli F., Frenzilli G., Bocchetti R., Annarumma F., Scarcelli V., Fattorini D., Nigro M. (2004). Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Aquat. Toxicol.* 68, 167–178.
- Roser S., Pool-Zobel B. L., Rechkemmer G. (2001). Contribution of apoptosis to responses in the comet assay. *Mutat Res*, 497: 169-175.
- Rydberg B., Johanson K. J. (1978). Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In Hanawalt P.C., Friedberg E.C., Fox C.F. (Eds): *DNA repair mechanism*; New York, Academic Press: 465-468.
- Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C. (1993). Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol. Today*, 14: 131-136.
- Sheehy M. R., Greenwood J. G., Fielder D. R. (1995). Lipofuscin as a record of “rate of living” in an aquatic poikilotherm. *J. Gerontol.* 50: B327–B336.
- Schmid W. (1975). The micronucleus test. *Mut. Res.*, 31: 9-15.
- Shugart L. R. (1994). Genotoxic Response in blood. In Fossi, M. C. and Leonzio, C. *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*. Lewis Publishers, CRC Press, US: 131-145.
- Shugart L. R. (1995). Biomarkers of DNA damage. In Bloom A.D, *Ecotoxicity and Human Health: a biological approach to environmental remediation*: 123-141.

- Sies H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.*, 215: 213-219.
- Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low level of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Res.*, 175: 184-191.
- Singh N. P., Danner D. B., Tice R. R., McCoy M. T., Collins G. D., Schneider E. L. (1989). Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm. *Exp Cell Res*, 184: p 461-470.
- Singh N. P. (2000) - A simple method for accurate estimation of apoptotic cells. *Exp. Cell. Res.* 256: 328-337.
- Stadman E. R. (1992). Protein oxidation and aging. *Science*, 257: 1220-1224.
- Stegeman J.J., Lech J.J. (1991). Cytochrome P450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure, *Environ. Health Perspect.* 90 101–109.
- Stephensen E., Sturve J., Forlin L. (2002). Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Comp. Biochem. Physiol. C* 133 (3), 435–442.
- Storey K. B. (1996). Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 29: 1715-1733.
- Sturve J., Stephensen E., Förlin L. (2005) . Effects of redox cycling compounds on DT diaphorase activity in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Hepatology* 4, 4.
- Suck-Young C., So-Jung K., Hae-Gyoung K., Ji Ho L., Younghee C., Hun L., Yangho K. 2003. Evaluation of estrogenicity of major heavy metals. *The Science of Total Environment* 312: 15 – 21.
- Terman, A., Brunk, U. T. (1998). Lipofuscin: mechanisms of formation and increase with age. *APMIS* 106:265–276.
- Terman A., Abrahamsson N., Brunk U. T. (1999). Ceroid/lipofuscinloaded human fibroblasts show increased susceptibility to oxidative stress. *Exp. Gerontol.* 34: 755–770.
- Terman A. (2001). Garbage catastrophe theory of aging: imperfect removal of oxidative damage? *Redox Rep.* 6: 15–26.
- Tice R.R. (1995). The single cell gel/Comet Assay: a microgel electrophoretic technique for detection of DNA damage and repair in individual cells. In Philips D. H., Venit S (eds): *Environmental Mutagenesis*. Bios Scientific Publishers LTD, Oxford, UK: 315-339.
- Tice R. R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartman A., Kobayashi H., Rojas E., Ryu J. C., Sasaki F. (2000). The single cell gel/Comet Assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 206-219.

- van der Oost R., Opprhuinzen A., Satumalay K., Heida H., Vermeulen N. P. E. (1996). Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) I. Bioaccumulation: biota-sediment ratios of PCBs, OCPs, PCDDs and PCDFs. *Aquat. Toxicol.*, 35: 21-46.
- van der Oost R., Goksøyr A., Celandier M., Heida H., Vermeulen N. P. E. (1996). Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. *Aquat. Toxicol.*, 36: 189-222.
- van Engeland M., Nieland L. J. W., Ramaekers F. C. S., Schutte B., Reutelingperger C. P. M. (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 31: 1-9.
- van Welie R., van Dijck R. G. J. M., Vermeulen N. P. E., van Sitter N. J. (1992). Mercapturic acids, protein adducts, and DNA adducts as biomarkers of electrophilic chemicals. *Crit. Rev. Toxicol.*, 22: 271-306.
- Vasquez M., Tice R. R. (1997). Comparative analysis of apoptosis versus necrosis using the single cell gel (SCGE) assay. *Environ. Mol. Mutagen.*, 29 (S28): 53.
- Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelings-perger C. (1995). A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods*, 184: 39-51.
- Viarengo A., Canesi L., Pertica M., Poli G., Moore M. N. and Orunesu M. (1990). Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *mytilus gallopro vincialis* lam. *Comp. Biochem. Physiol.* 97C: 37 - 42.
- Walton D. G., Acton A. B., Stich H. F. (1984). DNA repair synthesis following exposure to chemical mutagens in primary liver, stomach and intestinal cells isolated from Rainbow trout. *Cancer Res.*, 44 (3): 1120 -1121.
- Watanabe-Fukunaga R., Brannan C. I., Copeland N. G., Jenkins N. A., Nagata S. (1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defect in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*, 356: 314-317.
- Williams J. R., Little J. B., Shipley W. U. (1974). Association of mammalian cell death with a specific endonucleolytic degradation of DNA. *Nature*, 257: 754-755.
- Winston G. W., Di Giulio R. T. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organism. *Aquat. Toxicol.*, 19:137-161.
- Winston G.W., Moore M.N., Kirchin M.A., Soverchia C. (1996). Production by reactive oxygen species by haemocytes from the marine mussel *Mytilus edulis*: lysosomal localization and effects of xenobiotics. *Comp. Biochem. Phys. C* 113, 221–229.
- Worner, W., Screnk, D. (1996). Influence of liver tumor promoters on apoptosis in rat hepatocytes induced by 2-acetylaminofluorene, ultraviolet light, or transforming growth factor beta 1. *Cancer Res.*, 56 (6): 1272-1278.

- Wright S. C., Zhong J., Larrick J. W. (1994). Inhibition of apoptosis as a mechanism of tumor promotion. *FASEB J.*, 8: 654-660.
- Wyllie A. H., Rose K. A., Morris R. G., Steel C. M., Forrest E., Spandidos D. A. (1987). Rodent fibroblast tumors expressing human myc and ras genes: growth, metastasis and endogenous oncogene expression. *Br. J. Cancer*, 56: 251-259.
- Zs-Nagy I., Steiber J., Jeney F. (1995). Induction of age pigment accumulation in the brain cells of young male rats through ironinjection into the cerebrospinal fluid. *Gerontology* 41(Suppl. 2): 145–158.

## Links

- <http://www.iss.it/sitp/dist/index.html>
- <http://www.wwf.it/ambiente/dossier/EDC.pdf>